Experimentelle Untersuchungen zur Trypsin-Inaktivierung mit einem Trypsin- und Kallikrein-Inhibitor aus der Ohrspeicheldrüse des Rindes

von

EVA-MARIA SEIDL, geb. Degel

München 1962

Aus der Chirurgischen Klinik des Krankenhauses München rechts der Isar
Direktor: Prof. Dr. Georg Maurer

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR TRYPSIN-INAKTIVIERUNG MIT EINEM TRYPSIN- UND KALLIKREIN-INHIBITOR AUS DER OHRSPEICHELDRÜSE DES RINDES

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva-Maria Seidl, geb. Degel

aus

Baldham bei München

München 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Maurer

Mitberichterstatter: Herr Prof. Dr. Werle

Dekan: Herr Prof. Dr. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

INHALT

	Seite
Einleitung	3
DAS PANKREASFERMENT TRYPSIN	4
Eigenschaften des Trypsins	7
Trypsin-Inaktivierung durch einen Inhibitor	12
Vorkommen des Inhibitors	12
Bisher festgestellte Eigenschaften des Inhibitors	13
Pathologisch-physiologische Vorgänge im Pankreas	14
Behandlung der entzündlichen Pankreaserkrankungen (Anwendung des Trypsin- und Kallikrein-Inhibitors)	17
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
Methoden der Trypsinbestimmung	21
Versuche mit Trypsin und Trasylol in Puffer	23
Testkurve für β-Naphthylamin	23
Eichkurve für Trypsin	24
Verhalten des Trypsins bei Inkubation	25
Inaktivierung von Trypsin durch Trasylol	27
Reaktionsgeschwindigkeit der Inaktivierung	27
Größe der Inaktivierung bei Einwirken verschiedener Mengen Trasylol auf eine konstante Menge Trypsin	31
Untersuchungen am Sekret einer Pankreasfistel	34
Krankengeschichte	35
Untersuchungen des Fistelsekrets auf seine Bestandteile	36
Der quantitative Nachweis von Trypsin im Pankreassekret	38
Testkurve für β-Naphthylamin in Pankreassaft, der aktives Trypsin enthält	39
Eichkurve für Trypsin in Pankreassaft, der aktives Trypsin enthält	4o
Allgemeine Untersuchungen am Sekret der Pankreasfistel	41
Menge	43
Gehalt an aktivem Trypsin	43
Diastasegehalt	43
Zusammenhang zwischen Gehalt an Calcium und aktivem Trypsin im Pankreassekret	44

Seite

Untersuchungen über die Inaktivierungsfähigkeit des Pankreassekrets und sein Verhalten bei Trasylolgaben 45

Verhalten der Inaktivierungsfähigkeit des Pankreassekrets im Laufe des Tages 47

Verhalten der Inaktivierungsfähigkeit bei Trasylolgaben 47

Untersuchungen über die Stabilität des aktiven Trypsins in Pankreassaft 49

Zusammenfassung 5o

Literaturverzeichnis 54

Einleitung

Es ist seit langem bekannt, welche wichtige Rolle die Bauchspeicheldrüse in der Verdauung spielt. Sie erzeugt eine Reihe von Enzymen, die ins Duodenum gelangen und dort auf den Speisebrei einwirken. Aber diese Fähigkeit des Verdauens kann sich in verhängnisvoller Weise auch gegen die Drüse selbst richten. Es hat sich herausgestellt, daß es besonders die proteolytischen Fermente sind, die eine Selbstverdauung des Pankreas verursachen und zu schwersten Schädigungen der Drüse führen können. Lange Zeit warman nahezu machtlos gegen diese Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse. Nicht zuletzt brachte man ihnen vielleicht auch deshalb nur wenig klinisches Interesse entgegen.

Andererseits hat man aber auf experimentellem Weg, insbesondere durch Erzeugung von Pankreasnekrosen bei Tieren versucht, dem Problem der Pathogenese und Ätiologie der Pankreatopathien näherzukommen. Die Fortschritte der Enzymforschung in der physiologischen Chemie brachten ebenfalls neue Erkenntnisse und haben Wege für die Therapie aufgezeigt.

1928 entdeckten Kraut, Frey und Bauer einen Kallikrein-Inhibitor (21), von dem sich später herausstellte, daß er auch fähig ist, Trypsin zu inaktivieren. Damit ergaben sich für die Therapie der entzündlichen Pankreaserkrankungen neue Gesichtspunkte und das Problem rückte wieder mehr in den Mittelpunkt des Interesses.

Im Folgenden soll ein Überblick über die Eigenschaften des Trypsins und seine Rolle in der Physiologie und Pathologie der Bauchspeicheldrüse gegeben werden. Weiterhin soll die Problematik aufgezeigt werden, die sich daraus für die Behandlung der entzündlichen Pankreaserkrankunger ergibt.

Da die im zweiten Teil der Arbeit dargestellten Versuche eingehende Kenntnisse über das Trypsin voraussetzen, soll die Chemie dieses Ferments, soweit sie bis jetzt bekannt ist, ausführlicher dargestellt werden. Es ist aber zu berücksichtigen, daß die bisher bekannten Trypsineigenschaften größtenteils durch Experimente mit Reintrypsin in vitro erforscht wurden. Wie weit sie mit den Verhältnissen in vivo übereinstimmen, bleibt dahingestellt.

DAS PANKREASFERMENT TRYPSIN

Mit dem Namen "Trypsin" bezeichnete Kühne 1867 erstmals ein Gemisch proteolytischer Fermente aus dem Pankreas, in dem außer dem heute als Trypsin bezeichneten Enzym noch Chymotrypsin und Carboxypeptidase enthalten waren. Später gelang es dann, Trypsin allein zu isolieren und zu erforschen.

Das Trypsin wird hauptsächlich im Pankreas und in der Parotis als unwirksame Vorstufe, in Form der sogenannten Trypsinogen, gebildet. Da hier das Trypsin als Bestandteil des Bauchspeichels betrachtet werden soll, erscheint es notwendig, zunächst einmal den Bauchspeichel als solchen, seine Zusammensetzung und Produktion zu beschreiben.

Der Bauchspeichel

Die Untersuchung des aus Pankreasfisteln gewonnenen Sekrets ermöglichte in einigen Fällen das Studium von Menge und Zusammensetzung des Pankreassaftes.

Menge: Newman und Eisenstein (30) geben bei konstanten Ernährungsbedingungen eine durchschnittliche Tagesmenge (während 24 Stunden) von 1250 ml an. Innerhalb dieser 24 Stunden traten starke Schwankungen auf. Das Maximum der Ausscheidung wurde jeweils etwa 90 Minuten nach einer Mahlzeit erreicht, das Minimum des Tages lag zwischen 2 und 5 Uhr morgens. Nach Sinclair (34) ist die Menge des täglich abfließenden Bauchspeichels sehr unterschiedlich. Sie schwankt zwischen 600 und 2400 ml, ja es kommen gelegentlich auch Mengen von 90 und 120 ml vor.

Zusammensetzung: Der Pankreassaft besteht zur Hauptsache (98%) aus Wasser, in dem seine übrigen Bestandteile gelöst sind. Er enthält die Elektrdyte des Serums, jedoch in geringerer Konzentration. Die Summe der wichtigsten Salze, Bikarbonat und Natriumchlorid, ist in Milliäquivalent konstant. Steigt also die Sekretion des Bikarbonats an, so sinkt die des Chlorids entsprechend ab. Das Bikarbonat stammt aus dem Plasma, wie durch Injektion von Kohlendioxyd, das mit C^{14} markiert ist, bewiesen werden konnte (19). Wird $C^{14}O_2$ gespritzt, dann erscheint es nach 3 - 4 Minuten wieder

im Pankreassaft. Auch Natrium und Kalium verhalten sich in ihrer Ausscheidung umgekehrt proportional zueinander.

Das pH des Pankreassaftes liegt zwischen 7,9 und 8,5. Bei Volumenzunahme steigt die Alkalinität wie auch die Gesamtausscheidung der Enzyme, deren Konzentration (Menge pro ml) jedoch abnimmt.

Die wirksamen und damit wichtigsten Bestandteile des Pankreassaftes sind die Fermente. Diese sind die kohlenhydratspaltende Diastase, die Lipase zur Fettspaltung und Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidase zur Eiweißverdauung. Diastase wird in aktiver Form sezerniert. Allerdings scheinen für ihre Wirksamkeit Chlor-Ionen nötig zu sein. Auch die Lipase wird nicht eigentlich aktiviert, sondern durch Galle und Calciumseifen nur in ihrer Wirksamkeit gesteigert. Die proteolytischen Fermente werden als unwirksame Vorstufen, die sogenannten Profermente, ausgeschieden und müssen bei Bedarf erst aktiviert werden.

Synthese des Bauchspeichels

Wasser und Bikarbonat des Bauchspeichels, die für die Einstellung des alkalischen Milieus des Pankreassaftes verantwortlich sind, werden in den sogenannten zentroacinären Zellen, in den Schaltstücken und den kleinen Pankreasgängen produziert.

Die Fermente werden in den Acinuszellen synthetisiert. Ihr Aufbau geht nach Gülzow folgendermaßen vor sich:

Die zu ihrem Aufbau notwendigen Aminosäuren und anderen erforderlichen Stoffe wie Natriumphosphat, Kalium, Calcium und Magnesium gelangen aus den anliegenden Kapillaren in die Acinuszelle. Dort werden sie in das basophile Basalplasma, das Ergastoplasma eingelagert, das reichlich Phosphatasen enthält. In den Mikrosomen des Basalplasmas findet nun unter deren Größenzunahme die Polypeptidsynthese statt. Diese wird durch Ribonukleinsäure und wahrscheinlich auch Desoxyribonukleinsäure vom Zellkern aus gesteuert. In den Vakuolen des Golgiapparates, in denen für gewisse Enzyme wahrscheinlich auch die Endsynthese erfolgt, werden die entstandenen Fermente kondensiert und gestapelt. Dabei werden die Vakuolen in Zymogengranula umge-

wandelt, die, von einer Membran umgeben, die Verdauungsfermente enthalten. In dieser Form werden die Enzyme in das Gangsystem entleert. Bei der Extrusion zerreißt im allgemeinen die Membran(19).

Steuerung der Bauchspeichelsekretion

Flüssigkeits-Bikarbonat- und Fermentsekretion greifen ineinander und werden auf nervösem und humoralem Weg gesteuert. Die nervöse Beeinflussung geschieht durch das vegetative System, vor allem den Parasympathikus, die humorale durch Pankreozymin und Sekretin. Diese Regelung der Fermentsekretion durch Nervensystem und Hormone bedeutet eine doppelte Sicherung. Die nervale Steuerung besteht hauptsächlich in einer durch Neurone veranlaßten rhythmischen Flüssigkeitssekretion(19). Von geringer Bedeutung sind psychische Anregung und Eintritt von Speisen in den Magen. Dagegen wird durch Übertritt von Chymus in das Duodenum die Sekretion erheblich angeregt, wobei Menge und Zusammensetzung des Bauchspeichels wesentlich von der Art des Speisebreis abhängig sind. Nach Newman und Eisenstein steigt die Menge des sezernierten Bauchspeichels nach oralen Gaben von Kohlenhydraten (in Form von 1oo ml 5o%iger Glukoselösung) stark an, nach Eiweißgaben (1oo ml 25%ige Gelatinelösung) ist ein etwas geringerer Mengenanstieg und bei Zuführung von Fett (1oo ml reines Olivenöl) kaum noch eine Zunahme der Sekretion zu beobachten. Ähnliches berichtet auch Sinclair, der darüber hinaus bei Zuführen von Glukose und Proteinen eine Zunahme der Gesamtdiastase feststellen konnte. Nach Gülzow sollen Fette, Fettsäuren und Seifen die Bildung eines fermentreichen Bauchspeichels anregen. Die Menge und Zusammensetzung des Bauchspeichels dürfte also wesentlich von der Zusammensetzung der Nahrung abhängig sein.

Der stärkste physiologische Saftlocker ist die Salzsäure des Magens. Durch Freisetzung von Sekretin bewirkt sie eine Ausschüttung von Flüssigkeit und Bikarbonat. Über die Salzsäure des Magens wird auch Histamin indirekt wirksam. Außer Sekretin, Salzsäure und Histamin wirken auch Gallensäuren, Vitamin A, Äther und Magnesiumsulfat als Flüssigkeits- und Bikarbonatlocker. Fermentlocker sind Pankreozymin, Cholinergika (einschließlich Doryl und Insulin) Mecholyl und -nach Gülzow- die Öle.

Die Sekretion hängt von der Organdurchblutung ab. Organisch oder funktionell bedingte Passagestörungen im Pankreasgangsystem können den Sekretionsvorgang stark beeinträchtigen. Bei Schädigungen der Drüse ist die Sekretion der Fermente eher gestört als die von Flüssigkeit und Bikarbonat.

Ein Teil der Fermente, die im Pankreas gebildet werden, wird kontinuierlich ans Blut abgegeben. So kommt es, daß, besonders für Amylase, und Esterase ein ziemlich konstanter Blutspiegel nachgewiesen werden kann. Diese Enzyme werden dann durch die Nieren laufend wieder ausgeschieden.

Eigenschaften des Trypsins

Nachdem der Bauchspeichel als das Medium, in dem das Trypsin ausgeschieden wird und zur Wirkung kommt, beschrieben wurde, soll das Ferment selbst ins Auge gefaßt werden.

Das Trypsin ist ein Protein, das in kristallisiertem Zustand ein Molekulargewicht von 34000 aufweist (15). Das pH-Optimum eines Enzyms ist immer abhängig von seiner eigenen Natur, von Begleitstoffen, vom Puffer, vom Substrat und von der Temperatur. Beim Trypsin liegt es etwa bei pH 7,5 - 10,2. Das Ferment wird im Pankreas als inaktive Vorstufe, als Trypsinogen, gebildet. Dyckerhoff, Miehler und Tadsen nahmen an, daß Trypsin im frischen Pankreas als Verbindung mit einem Inhibitor vorliege, so daß die Aktivierung nur in einer Entfernung des Inhibitors bestehe und daß keine spezielle inaktive Form des Ferments, also Trypsinogen, existiere. Kunitz und Northrop erklären aber diese Auffassung für ungenügend. Nach ihnen ist das Trypsin außer durch den Inhibitor noch durch ein Schutzpeptid inaktiviert. Der Inhibitor spielt jedoch eine sehr wichtige Rolle bei der Regulierung der Trypsinogenaktivierung. Die Inhibitor-Trypsin-Verbindung erhielten Kunitz und Northrop als hexagonale Kristalle. Sie besteht aus je einem Molekül Trypsin und Inhibitor und kann durch Trichloressigsäure getrennt werden, die das Trypsin ausfällt, während der Inhibitor in Lösung bleibt.

Trypsinogen-Aktivierung

Der Mechanismus der Trypsinbildung aus Trypsinogen durch Enterokinase ist seit der Entdeckung der Enterokinase durch Schepowalnikow(33) im Jahre 1899 Gegenstand dauernder Kontroversen gewesen. Pawlow und Schepowalnikow betrachteten die Enterokinase als typisches Enzym. Spätere Versuche ergaben aber, daß die Menge des gebildeten Trypsins nicht unabhängig war von der Enterokinasekonzentration wie man es bei einer Enzymreaktion erwarten würde. Daraus schloß man, daß die Trypsinbildung im wesentlichen in einer stöchiometrischen Verbindung von Trypsinogen und Enterokinase bestehe, wobei ein aktives Ferment, die "Trypsinkinase" gebildet wird. Dagegen sprach aber die autokatalytische Transformation des Trypsins bei pH 7,0-9,0 ohne Hilfe eines Katalysators. Außerdem entdeckte man, daß die Aktivierung auch mit Hilfe einer aus Schimmelpilzen gewonnenen Kinase möglich ist(25). Diese Kinase zeigte die Eigenschaften eines typischen Ferments und der Prozess stellte eine unimolekulare katalytische Reaktion dar, bei der die Menge des gebildeten Trypsins unabhängig von der Menge der benützten Pilzkinase war. Kunitz und Northrop wiesen nun 1939 nach, daß die Umwandlung von Trypsinogen in Trypsin in einer Hydrolyse besteht, die durch Enterokinase, die also als Ferment aufzufassen ist, katalysiert wird. Die Aktivierung findet gewöhnlich im Duodenum statt.

Auch Zytokinasen haben die Fähigkeit, Trypsinogen zu aktivieren. Diese Tatsache gewinnt bei der Pankreasnekrose große Bedeutung, da beim Zugrundegehen von Zellen Zytokinasen frei werden.

Kurz zusammengefaßt kann man sich die Trypsinogenaktivierung im Körper etwa so vorstellen: Trypsinogen wird mit Hilfe von Enterokinase (im Normalfall) beziehungsweise von Zytokinasen (bei Pankreasnekrose) in Trypsin umgewandelt. Da Trypsin auch autokatalytisch wirksam ist, setzt nun eine Kettenreaktion ein.

Trypsin kann auch die Aktivierung von Chymotrypsinogen und anderen Proteasen katalysieren, während umgekehrt eine Umwandlung von Trypsinogen in das aktive Ferment durch Chymotrypsin und die anderen proteolytischen Fermente nicht möglich ist.

Substrat

Lebendes Gewebe wird von Trypsin normalerweise nicht angedaut. Erst bei Schädigung der Zellen z.B. durch Histamin (Dragstedt) ist die Möglichkeit einer Andauung gegeben. Nach Nord, Bier und Terminiello(31) greifen proteolytische Fermente, besonders Trypsin, denaturierte Proteine wesentlich leichter an als native. Linderström und seine Schule nehmen an, daß Trypsin die Denaturierung von nativen Proteinen katalysiert, wodurch die Verdauung ermöglicht wird. Der Angriffspunkt für das Ferment sind die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, und zwar wird die Peptidbindung an der Carboxylgruppe gespalten.

Das Trypsin wirkt nicht nur auf Stoffe, die verdaut werden sollen. In diesem Zusammenhang erscheint es erwähnenswert, daß es auch eine beschleunigende Wirkung auf die Blutgerinnung ausübt. Waldschmidt-Leitz, Stadtler und Steigenwald nahmen an, daß das Enzym ähnlich auf Fibrinogen wirkt wie Thrombin. Eagle und Harris glaubten, daß die Wirkung des Trypsins in einer katalytischen Transformation von Prothrombin in Thrombin bestünde, während Mellanby und Pratt den Grund in einer Freisetzung von aktiver Thrombokinase sehen, die dann in Gegenwart von Ca-Ionen Prothrombin in Thrombin umwandelt.

Stabilität

Die Stabilität von Trypsinlösungen ist von ihrem Reinheitsgrad, der Konzentration, der Temperatur, bei der sie aufbewahrt werden und besonders von ihrem pH abhängig(29). In saurer Lösung ist das Enzym relativ stabil. Wird das Milieu alkalischer als pH 6,o, so nimmt die Stabilität rasch ab. Nord, Bier und Terminiello erklären das damit, daß in einer Trypsinlösung ein Gleichgewicht besteht zwischen einer nativen (A) und einer denaturierten (D) Form des Ferments. Da Trypsin denaturierte Proteine angreift, wird auch seine eigene denaturierte Form über einen intermediären bimolekularen Komplex von der nativen verdaut. Da sich laufend wieder das Gleichgewicht $A \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} D$ einstellt, ist es verständlich, daß durch Verringerung der Menge der nativen Form die Aktivität abnimmt. Es findet hier also Autolyse statt.

Tri- und bivalente Kationen, besonders Calcium und Mangan haben eine stabilisierende Wirkung. So fand Gorini(18), daß Trypsin in Abwesenheit von Ca-Ionen bei 26°C und pH 7,8 in 8 Stunden völlig inaktiviert wurde, während bei Gegenwart von 10^{-2} mol Calcium in der gleichen Zeit nur eine Inaktivierung von 5% stattfand. Eine ähnliche Wirkung wird bei Zugabe von Mangansalzen beschrieben (12), nur sind diese zu Versuchen mit Trypsin ungeeignet, da sie im Alkalischen in Säuren umgewandelt und gefällt werden.

Aus der stabilisierenden Wirkung der Ca-Ionen folgert Gorini, daß die aktive, stabile Form des Ferments ein Eiweiß-Ca-Komplex ist, und daß das Calcium ihm die für seine Aktivität erforderliche Struktur sichert. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die, daß das Calcium sich mit der denaturierten Form so verbindet, daß die native Konfiguration oder eine dieser angenäherte Form wieder hergestellt wird. Aus der Tatsache, daß das Calcium auf die Verdauung anderer Proteine keinen Einfluß hat, schließen Nord und Bier, daß die Verminderung der Autodigestion dadurch zustandekommt, daß das Gleichgewicht $A \rightleftharpoons D$ auf die Seite des nativen Ferments verschoben wird. Das wäre auch ein indirekter Beweis für das Vorhandensein dieses Gleichgewichts.

Inaktivierung

Auch die Inaktivierung von Trypsin ist von verschiedenen Faktoren abhängig, besonders der Temperatur und dem pH. So nimmt z. B. die Aktivität der gleichen Trypsinlösung nach Kunitz und Northrop bei 30°C bei einem pH von 12,8 innerhalb von 10 Minuten genauso ab, wie in einer 0,5 molaren HCl-Lösung in 50 Stunden(20).

Eine reversible Inaktivierung tritt bereits durch Temperaturerhöhung oder durch starkes Alkalischmachen der Lösung ein. Der Aktivitätsverlust ist in diesem Falle bedingt durch das Erscheinen von reversibel denaturiertem Protein, das in 0,5 mol Salzlösungen bei pH2,0 unlöslich ist, während sich das native, aktive Protein sogar in molaren Salzlösungen bei pH 2,0 löst. Wenn die Lösung bei pH 2,0 und etwa 20°C einige Zeit steht, wandelt sich das denaturierte Enzym wieder in das native um. Bei einer Temperatur von 0°C erhält man das reversibel denaturierte Protein bei

pH 8,0. Erhöht man die Alkalinität der Lösung, so steigt der Gehalt an dieser Form des Enzyms an. Diese Abnahme des aktiven Ferments zwischen pH 8,0 und 13,0 stimmt mit der Abnahme der Verdauung von Proteinen durch Trypsin in diesem pH-Bereich überein.

Die obengenannten Lösungen bleiben nur kurze Zeit reversibel, dann werden sie allmählich irreversibel inaktiv. Dabei erscheinen verschiedene Reaktionsprodukte, deren Natur von der Temperatur und vom pH der Lösung abhängt.

Unter pH 2,0 wird das Enzym bei Hitzeeinwirkung durch eine monomolekulare Reaktion irreversibel denaturiert. Die irreversible Denaturierung bei alkalischerem pH als 13,0 entspricht der bei stark saurem Milieu.

In einem pH-Bereich von 2,0-9,0 wird das Trypsin-Protein durch Autolyse langsam hydrolysiert. Die Zersetzungsprodukte erscheinen dann in der Lösung. Dabei handelt es sich um einen bimolekularem Vorgang. Die Annahme, daß die Selbstverdauung des Trypsins zu dieser Aktivitätsabnahme beiträgt, wird bestärkt durch die Wirkung der Temperatur auf die Größe der Inaktivierung. Außerdem erfolgt in diesem pH-Bereich die Bildung eines sogenannten "inerten Proteins", das ist ein Eiweißkörper, der reaktionsträge ist und weder durch Trypsin noch durch Enterokinase oder andere Trypsinaktivatoren in aktives Trypsin umzuwandeln ist. Die Bildung dieses Proteins geschieht, wie Kunitz fand, immer wenn kristallines Trypsinogen, das eine Spur Trypsin enthält, in wässriger Pufferlösung von pH 5,0- 9,0 gelöst wird. Da in diesem pH-Bereich auch die autokatalytische Transformation von Trypsinogen in Trypsin geschieht, weicht der Prozess der Trypsinbildung unter diesen Umständen von der Reaktionsweise des einfachen autokatalytischen Typs ab. Mit der Aktivierung des Trypsins geht eine gleichzeitige irreversible Inaktivierung des Enzyms durch die Bildung eines inerten Proteins einher (24). Kunitz deutet die Verhältnisse folgendermaßen:

1. Trypsinogen $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ Trypsin
2. Trypsinogen $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ inertes Protein

Beide Reaktionen sind unimolekular und von der Konzentration des Trypsinogens (Substrat) und der des Trypsins (Katalysator) abhängig. Auch diese Reaktionen sind pH-abhängig. Dabei nimmt die Bildung von trägem Protein bei steigendem pH rascher zu als die des Trypsins. In saurem pH wird kein inertes Protein gebildet. Deshalb wird wahrscheinlich das Trypsinogen durch Pilzkinase bei pH 3,0 vollständig in Trypsin umgewandelt.

Eine relativ leichte Inaktivierbarkeit von Trypsin durch Acetylierung der freien Aminogruppen mit Säureanhydrid und Natriumazetat erwähnen Neurath und Green.

Wie anfangs schon beschrieben wurde, liegt das Trypsin im Pankreas als Proferment: Trypsinogen, vor. So liegt es nahe, eine Inaktivierung des aktiven Ferments durch den Inhibitor herbeizuführen.

Trypsin-Inaktivierung durch einen Inhibitor

Kraut, Frey und Bauer berichteten 1928 über die Inaktivierbarkeit des von ihnen gefundenen Kreislaufhormons Kallikrein. Später stellte man fest, daß dieser Kallikrein-Inhibitor bei Vorhandensein von Trypsin seine Wirksamkeit einbüßte, was man auf eine Zerstörung des Hemmstoffs durch das Ferment zurückführte. 1952 fanden schließlich Werle, Maier und Ringelmann, daß der Inaktivator nicht durch Trypsin zerstört wird, sondern dieses und Chymotrypsin inaktiviert.

Vorkommen des Inhibitors

Der Kallikrein- und Trypsin-Inhibitor konnte aus Organextrakten des Menschen und verschiedener Tiere wie der Ziege, des Schafes, des Schweins, des Pferdes, des Hundes und der Weinbergschnecke isoliert werden. Eine besonders reiche Ausbeute erzielte man bei Rindern (40). Der Inaktivator ist im Körper sehr verbreitet und wurde im Blutserum (nicht in den Blutkörperchen), den Lymph-, Ohr- und Bauchspeicheldrüsen, der Milz, der Leber und anderen Organen gefunden.

Auch ein aus Kartoffeln gewonnener Kallikrein-Hemmkörper besitzt die Fähigkeit, Trypsin und Chymotrypsin zu inaktivieren (39), ist aber nach Werle und Appel nicht identisch mit dem aus tierischen Organen gewonnenen, sondern unterscheidet sich von diesem durch Löslichkeitseigenschaften, durch sein Verhalten beim Kochen, sowie in der pH-Abhängigkeit seiner Inaktivierungsfähigkeit für Kallikrein. Außerdem fanden Werle, Appel und Happ in der Kartoffel neben dem Trypsin-Kallikrein-Inaktivator einen Trypsin-Inhibitor, der keine kallikreinhemmende Wirkung besitzt.

Ein aus Sojabohnen isolierter Trypsin-Inhibitor besitzt keine Inaktivatorwirkung gegenüber Pankreas- und Harnkallikrein.

Bisher festgestellte Eigenschaften des Inhibitors

Die Firma Bayer brachte vor kurzem einen aus Tierorganen gewonnenen Kallikrein- und Trypsin-Inaktivator unter dem Namen "Trasylol" in den Handel. Dieser ist zu den Polypeptiden zu rechnen und hat ein Molekulargewicht von etwa 6000, wie es auch Kunitz für den Trypsin-Inhibitor angibt. Er ist dialysabel und gibt mit eiweißfällenden Substanzen wie Trichloressigsäure keinen Niederschlag. Kunitz stellte auch eine schwache Biuretreaktion fest (23). Nach Kraut, Werle und Frey wird der Inaktivator bei pH 2,0 zerstört. Die Bindung des Trypsins ist nach den Feststellungen von Kraut und Körbel-Enkhardt im Gegensatz zur Kallikrein-Inaktivierung nicht pH-abhängig. In wässrigen Lösungen ist der Kallikrein-und Trypsin-Inaktivator relativ wärmebeständig und lange Zeit haltbar.

Bei gleichzeitiger Anwendung derjenigen Mengen von Kallikrein und Trypsin, denen gegenüber der Inaktivator wirkungsidentisch ist, wird 80 - 90 % der Kallikreinwirkung gehemmt, während die Trypsinwirkung nur eine geringe Abnahme zeigt. Der Inhibitor hat also eine wesentlich höhere Affinität zu Kallikrein als zu Trypsin.

Da nach den heutigen Vorstellungen bei der Pankreasnekrose und bis zu einem gewissen Grade auch bei der Pankreatitis die Aktivierung des Trypsins im Pankreas mit anschließender Selbstverdauung der Drüsenzellen eine wichtige Rolle spielt, findet die-

ser Inhibitor neuerdings in der Medizin Anwendung in der Therapie tryptischer Pankreaserkrankungen. Daher erscheint es notwendig, zunächst kurz auf die Pathogenese der Pankreatopathien einzugehen, um dann einen Überblick über die Erfahrungen zu geben, die bis jetzt mit der Inaktivator-Therapie gemacht worden sind.

Pathologisch-physiologische Vorgänge im Pankreas

Die primären Erkrankungen des Pankreas sind gekennzeichnet durch Verdauungsvorgänge am körpereigenen, lebenden Gewebe; Vorgänge, die durch eine Aktivierung eiweißverdauender Fermente am falschen Ort zustandekommen. In der Pathogenese besteht kein grundlegender Unterschied zwischen der leichten Pankreatitis und der schweren hämorrhagischen Pankreasnekrose - auch wenn die Ätiologie noch so verschiedenartig sein mag. Selbst bei der leichten Pankreatitis kommt es nämlich zu kleinsten autodigestiven Vorgängen am Drüsengewebe"(6). Im Mittelpunkt des Krankheitsmechanismus der Pankreatitis steht die Bauchspeichelentgleisung und die Fermentaktivierung.

Kommt es nach einem Sekretionsreiz zu einer stärkeren Abflußbehinderung des Bauchspeichels, so kann es zu einem Platzen der schwächsten Stellen des Pankreaskanalsystems, der initialen Speichelröhrchen kommen. Der Bauchspeichel ergießt sich in das Zwischengewebe in der unmittelbaren Umgebung der Acini (Doerr und Becker). Er kann aber sicher auch aus der Acinuszelle direkt in das Interstitium gelangen (Katsch). Die Speichelentgleisung ist mit der Fermententgleisung gleichzusetzen. Der Rückstau des Bauchspeichels wird meist durch ein Abflußhindernis an der Papilla Vateri hervorgerufen, das organischer und funktioneller Natur sein kann. Die engen anatomischen Beziehungen zwischen Gallengangs- und Pankreasgangsystem erklären die Folgen, die ein Gallenstein für die Bauchspeicheldrüse haben kann, wenn es bei Steinabgang zu einer Abflußbehinderung des Bauchspeichels kommt (27). Ob diese Situation eintritt, hängt ab von Größe und Lage des Gallensteins in Beziehung zur anatomischen Konstruktion und pathologischen Situation am Zusammen-

fluß des Ductus choledochus und Ductus pankreaticus an der Papille. Anatomische Organisation der Gangmündungsverhältnisse, Gangepithel-Metaplasien im Bereich der Papille, die potentiellen Engen am Porus papillae wie überhängende Schleimhautlippen, Hyperplasie der benachbarten Brunnerschen Drüsen, Entzündung, Sklerose und Adenomyose der Papille bzw. des Oddi'schen Muskels sowie funktionelle Dystonien können dabei eine wichtige Rolle spielen. Der Rückstau von Bauchspeichel führt aber nur dann zur Ausbildung eines Speichelödems, wenn das Pankreassekret unter hohem Druck ausgeschieden wird (2o). Die Intensität der exkretorischen Pankreassekretion wiederum ist vom Nahrungsreiz abhängig.

Die Frage, wie die eiweißverdauenden Fermente aus den Profermenten des Speichelergusses aktiviert werden, ist noch nicht restlos geklärt. Nach Schepowalnikow ist es eine zelleigene Substanz der Bauchspeicheldrüse, die Cytokinase, die das Trypsinogen intrapankreatisch aktiviert (33).

Voraussetzung für das Freiwerden dieses Stoffes ist allerdings die Zerstörung von Pankreaszellen. Möglicherweise führen funktionell-nervale Strombahnalterationen (Mallet-Guy) durch Störung der Blutversorgung zu einer Zellschädigung. Auch organische Gefäßleiden wurden als eine der Voraussetzungen für die Entstehung der Pankreasnekrose nachgewiesen (5). Andererseits kann es bei einer Pankreatitis, die durch lymphogene Fortleitung von Keimen bei einer eitrigen Cholecystitis oder durch kanalikuläre Infektion des Bauchspeichels bei einer chronisch schleichenden Cholecystitis entstanden ist, zur Autolyse einzelner Zellen mit Freisetzung von Cytokinase kommen. Auch an eine toxische Zellschädigung mit Zelltod durch Bakterientoxine ist zu denken.

Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus der Erkenntnis, daß das Trypsinogen nicht eine noch unvollständige Vorstufe des Trypsins darstellt. In der Acinuszelle wird vielmehr gleichzeitig mit dem Trypsin ein Inhibitor produziert und mit diesem gekoppelt. Durch Enterokinase wird der Inhibitor vom Trypsin abgespalten und dieses dadurch aktiviert. Es ist dankbar, daß unter besonderen Umständen die intrazelluläre Inhibitorproduktion mit

der Trypsinproduktion nicht mehr Schritt zu halten vermag und somit aktives Trypsin innerhalb des Gangsystems der Drüse vorliegt. Entsteht in einer solchen Situation ein interstitieller Speichelerguß, so ist eine unmittelbare Trypsi[illegible] möglich.

Ob und in welchem Ausmaß eine Selbstandauung der Bauchspeicheldrüse zustandekommt, ist eine Frage der Relation zwischen Trypsin und körpereigenem Inhibitor. Wenn der Körper das angebotene Trypsin am Ort seiner Freisetzung nicht oder nicht rechtzeitig inaktivieren kann, so vermag dieses auf die kleinen Gefäße und Nervenendigungen einzuwirken. An den Gefäßen kommt es zu Spasmen, zu Blutstase und durch Andauung zu Blutungen und Thrombosen. Auf die örtlichen sekretorischen Nerven übt das Trypsin zweifellos einen erheblichen Reiz aus.

Minderdurchblutung und sekretorische Reizung des fermentproduzierenden Parenchyms ergeben einen Circulus vitiosus, der schließlich von der Andauung einzelner Acinuszellen bis zur Selbstverdauung der ganzen Bauchspeicheldrüse führen kann, wenn es nicht gelingt, den Kreis rechtzeitig zu durchbrechen.

Die Fermententgleisung ins Blut kommt durch Resorption der Pankreasfermente aus dem Speichelerguß zustande. Daneben besteht schon physiologischerweise eine ständige Abgabe gewisser Mengen von Pankreasfermenten in die Blutbahn.

Die dem Chirurgen oft schon bei der Eröffnung des Bauchraums als "Kalkspritzer" ins Auge fallenden Fettgewebsnekrosen spielen in der Pathophysiologie der Pankreatitis wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle, da die Lipase erst nach Andauung der Fettgewebszellmembran durch tryptische Fermente wirksam werden kann.

Eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung von Pankreatopathien spielen die Traumen, die häufig auch bei operativen Eingriffen gesetzt werden. Dabei kommt es zur Zerstörung von Parenchym und zu Obstriktionen des Gangsystems oder zu Gefäßalterationen auf Grund eines Schocksyndroms. Eine postoperative Pankreasnekrose ist ein recht seltenes Ereignis (26). Bei der weit häufiger auftretenden postoperativen Pankreatitis dürfte es sich jedoch meistens um das Wiederaufflackern einer latenten, bereits vor der Operation bestehenden Pankreatitis handeln.

Es konnte in diesem Rahmen nicht auf alle zur Diskussion stehenden Möglichkeiten eingegangen werden, wie man sich die Entstehung einer akuten Pankreasnekrose vorstellen kann. Es sollte in erster Linie auf die unerläßlichen Vorbedingungen hingewiesen werden: Bauchspeichelentgleisung und Trypsinaktivierung bei hoher Intensität der exkretorischen Pankreassekretion.

Das gleiche wie für die Pathogenese der akuten gilt auch für die der chronischen Pankreatitis, bei der mikrotryptische Vorgänge stattfinden. Hier gewinnen noch chronische Ernährungsschäden z.B. chronische Eiweißkarenz, die auch für die bei Alkoholikern häufig auftretende Pankreatitis als Ursache angenommen wird, eine besondere Bedeutung.

Außer den Erscheinungen am Pankreas selbst fällt bei der Pankreasnekrose eine oft erhebliche Störung des Kreislaufsystems auf. Es kommt zu einem schweren Kollaps, der früher in vielen Fällen die eigentliche Todesursache war. Werle, Forell und Maier erklären das damit, daß aktives Trypsin in der Blutbahn das Kallikreinogen in Kallikrein umwandelt, das sowohl selbst den Blutdruck herabsetzt, als auch einen weiteren blutdrucksendenken Wirkstoff des Plasmas, das Kallidin aus Kallidinogen freisetzt. Außerdem wandelt das Trypsin Bradykininogen in das ebenfalls blutdrucksenkende Bradykinin um (36) (37).

Behandlung der entzündlichen Pankreaserkrankungen (Anwendung des Trypsin- und Kallikrein-Inhibitors)

Wenn der Patient zum Arzt kommt ist eine kausale Therapie der primär entzündlichen Prankreaserkrankungen nicht mehr möglich. Man kennt im Einzelfall die Ursache des Speichelergusses auch gar nicht. Die Fermententgleisung besteht bereits und ist nicht mehr rückgängig zu machen - es hat sich sogar schon die Fermentaktivierung vollzogen. So kommt es darauf an, so rasch wie möglich in den Krankheitsmechanismus einzugreifen. Das geschieht heute mit dem bereits beschriebenen Inaktivator, der das aktivierte Trypsin in der Bauchspeicheldrüse und gleichzeitig auch das Kallikrein im Kreislauf blockiert bzw. unwirksam macht (2).

Nachdem die hemmende Wirkung des Kallikrein-Inaktivators auf Trypsin erkannt worden war, wandte Frey ihn bei Pankreatitis an, in der Hoffnung, das unter pathologischen Bedingungen schon innerhalb der Drüse aktiv werdende Trypsin in seiner Wirkung abzuschwächen oder sogar zu inaktivieren (17). Er war der erste, der 1953 an 3 Fällen die offenbar günstige Wirkung dieses nunmehr von der Firma Bayer unter dem Namen Trasylol hergestellten Hemmstoffes zeigen konnte.

Beim Studium der Veröffentlichungen über die Hemmkörper-Therapie mit Trasylol (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 1o, 16, 27, 28, 3o, 34, 35, 38) fällt auf, daß fast alle Autoren eine frühzeitige Anwendung des Medikaments und eine möglichst hohe Dosierung empfehlen. Bedacht, Werle und Mitarbeiter wenden zunächst etwa 1oooo E im akuten Stadium an. Asang wie später auch Werle geben an, daß anfangs Dosen von 4o ooo E noch günstiger und sicherer wirken und komplikationslos vertragen werden. Daß die Verträglichkeit des Präparates sehr gut ist, stellten auch Bernard, Paget und Lamelin im Tierexperiment fest (11). Sie injizierten Hunden von 6 kg Körpergewicht ohne nachteilige Folgen die gleichen Mengen in 3 Stunden, wie für den erwachsenen Menschen von 7o kg Gewicht für 24 Stunden vorgeschlagen waren.
Eine der wichtigsten Aufgaben der vorliegenden Arbeit war es, experimentell die Notwendigkeit dieser hohen Dosierung zu beweisen und zu begründen.
Nach einem von Asang vorgeschlagenen Behandlungsschema für die akute Pankreasnekrose (2) soll, sofort nachdem die Diagnose der beginnenden oder bereits in Gang befindlichen PN gestellt ist, der Fermentinaktivator in höchsten Dosen verabreicht werden. Da der Hemmkörper von jeweils gleichen Mengen zwar 8o% Kallikrein aber nur 2o% Trypsin inaktiviert, ist die hohe Dosierung des Medikaments im Anfang notwendig, damit auch das Trypsin im Pankreas so rasch wie möglich inaktiviert wird. Die Dosierung richtet sich nach der Schwere des klinischen Bildes. Es werden bis
loo ooo E pro Tag angewendet, von denen ein Teil langsam unverdünnt i.v. injiziert, das Übrige als Zusatz zu einer Leberschutzinfusion verabreicht wird. Diese soll dazu dienen, die Leber gegen die Wirkung der hochtoxischen Zerfallprodukte - gewissermaßen Leichengifte - zu schützen, die im nekrotischen Pankreasgewebe gebildet werden und bei Resorption, soweit ihr Abtransport über die Blutbahn erfolgt, auf dem kürzesten Weg und beinahe unverdünnt in die Leber gelangen (6).

Selbstverständlich behält der alte Grundsatz einer absoluten Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz auch unter der Hemmkörpertherapie uneingeschränkte Gültigkeit. Er dient der Ruhigstellung der Bauchspeicheldrüse. Mit Hilfe von Atropin oder Diamox (2-Acetylamino-1,3,4-thiodiazol-5-sulfonamid) ist es möglich,

die Bemühungen zur Dämpfung der Drüsensekretorik zu intensivieren. Auch die Anwendung von Ganglienblockern und durchblutungsfördernden Mitteln als Infusionszusatz (Panthesin-Hydergin) hat sich bewährt. Unter Umständen ist es notwendig, den Kreislauf zu stützen. Morphium darf nicht verabreicht werden, da es einen Sphinkterspasmus zur Folge hat. Ein chirurgisches Eingreifen im akuten Krankheitsstadium ist weder notwendig noch sinnvoll.

Der Hemmkörper soll in hoher Dosierung bis zur Besserung des Krankheitsbildes und Normalisierung der pathologischen Diastasurie verabreicht werden. Auch die Infusionen werden beibehalten. Durch Überwachung des Wasser- und Elektrolythaushalts und entsprechende Zusammensetzung der Infusion kann das Nahrungs- und Flüssigkeitsdefizit ausgeglichen werden. Blut- und Plasmatransfusionen sind zusätzlich anzuraten.

Nach Abklingen des akuten Krankheitsstadiums soll etwa 14 Tage lang eine Erhaltungsdosis von täglich 5 ooo - 1o ooo E Trasylol beibehalten werden.

Asang warnt ausdrücklich vor zu niedriger Dosierung und vorzeitigem Absetzen des Trasylols. Unter der frühzeitigen Inaktivatorbehandlung wird nicht nur ein Harndiastase-Anstieg auf alarmierend hohe Werte vermieden, sondern es bessert sich auch das ganze Krankheitsbild scheinbar sehr rasch. Dadurch unterschätzt man die Schwere der Erkrankung. Es kommt dann nach vorzeitigem Absetzen des Medikaments ohne stürmische klinische Erscheinungen zur erneut fortschreitenden Nekrose, zum retroperitonealen Pankreas- und Senkungsabszeß und gelegentlich auch zur Andauung von Nachbarorganen.

In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, daß der Inhibitor zugleich mit dem Trypsin das Kallikrein inaktiviert. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von Trypsin- und Kallikreinmengen, denen gegenüber der Inaktivator wirkungsidentisch ist, werden 8o% des Kallikreins aber nur 2o% des Trypsins gehemmt. So ist es auch aus diesem Grund angezeigt, hohe Trasyloldosen zu verabreichen, um trotz der größeren Affinität des Medikaments zum Kallikrein eine möglichst intensive Wirkung desselben auf das Trypsin zu erreichen und so der Selbstverdauung Einhalt zu gebieten.

Durch die Inaktivatortherapie ist es zwar möglich, in den Krankheitsmechanismus der entzündlichen Pankreaserkrankungen einzugreifen. Man muß sich aber darüber im klaren sein, daß sie streng genommen gar keine echte Therapie, sondern nur eine Prophylaxe ist, da sie lediglich die Andauung neuer Drüsenzellen verhindert, nicht aber eine bereits eingetretene Nekrose von Zellen oder Zellverbänden rückgängig macht. Die tryptischen Zerfallsherde im Pankreas können durch die Bildung von hochtoxischen Zerfallsprodukten lebensbedrohlich sein. Bei größeren nekrotischen Herden kann eine tödliche Allgemeinintoxikation mit ausschließlich konservativen Methoden nicht verhindert werden. So ist es notwendig, solche Nekroseherde rechtzeitig operativ zu entfernen. Während die Bauchspeicheldrüse früher als operationsfeindliches Organ galt, sind Eingriffe an ihr unter Inaktivatorschutz heute selbst bei vorausgegangener Pankreasnekrose ohne weiteres möglich.

Erfolgreich wird das Trasylol auch prophylaktisch bei Cholecystektomien angewandt. In diesem Fall werden bei Operationsbeginn 1o ooo bis 2o ooo E unverdünnt i.v. verabreicht, um einen gewissen Hemmkörperspiegel im Blut zu erreichen. Intraoperativ kommt man je nach Risiko mit 1o-2o ooo E Trasylol in Leberschutzinfusion aus. Postoperativ wird sicherheitshalber für mehrere Tage eine Erhaltungsdosis beibehalten.

Die Therapie der Pankreatitis und Pankreasnekrose mit dem Kallikrein- und Trypsin-Inaktivator gewinnt also immer mehr an Bedeutung. Es ist allerdings noch wenig darüber bekannt, wie die Hemmung vor sich geht. Deshalb war es die Aufgabe der vorliegenden Versuche, der Frage des Inaktivierungsmechanismus auf den Grund zu gehen; Weiterhin soll mit Hilfe dieser Experimente versucht werden, die Notwendigkeit der hohen Dosierung zur Therapie der primären Pankreaserkrankungen, die in der Klinik immer wieder festgestellt wurde, zu begründen. Es sollte festgestellt werden, von welchen Faktoren die Inaktivierung abhängig ist: welche Inaktivatormengen notwendig sind, um eine bestimmte Trypsinmenge

zu hemmen, was bei Überwiegen eines der beiden Reaktionspartner in der Lösung geschieht und welche Zeit zur Inaktivierung benötigt wird. Um diese Fragen zu klären, waren Vorversuche über die Selbstinaktivierung des Trypsins bei Inkubation notwendig. All diese Versuche wurden mit kristallisiertem Trypsin und Trasylol in Pufferlösung durchgeführt, also in vitro.

Es bot sich dann Gelegenheit, das Sekret einer postoperativen Pankreasfistel hinsichtlich seines Trypsin- und Inaktivatorgehaltes zu untersuchen und einige durch die Versuche in vitro gewonnene Ergebnisse auch in vivo zu überprüfen. Da das Sekret nur kurze Zeit aktives Trypsin enthielt, mußten die meisten Untersuchungen mit inaktivem Pankreassaft durchgeführt werden. So war es nicht möglich, die Wirkung von Trasylolgaben auf die tryptische Aktivität des Pankreassaftes festzustellen, sondern nur, zu untersuchen, ob in diesem Fall Schwankungen der Inaktivierungsfähigkeit eintreten.

Ziel all dieser Untersuchungen war es, die aus verschiedenen Beobachtungen heraus vom Kliniker erhobene Forderung nach genügend hoher Dosierung des Trasylols bei akuten Pankreaserkrankungen auch experimentell zu unterbauen. Diese Experimente sollen im zweiten Teil der Arbeit dargestellt werden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Methoden der Trypsinbestimmung

Bis vor kurzer Zeit war der quantitative Nachweis von Trypsin methodisch sehr schwierig und unsicher. Die klassischen Methoden zur Bestimmung der "tryptischen Aktivität", womit die gemeinsame Wirkung von Trypsin und Chymotrypsin gemeint ist, waren folgende:

1) Die titrimetrische Bestimmung der hydrolysierenden Wirkung des Ferments auf Casein oder Gelatine als Substrat nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz (41).

2) Die Absorptionsmessung der tyrosin- und phenylalaninhaltigen Casein-Abbauprodukte bei 280 mμ, nach Kunitz.

3) Die kolorimetrische Messung tyrosin- und tryptophanhaltiger, nach der enzymatischen Einwirkung mit Trichloressigsäure nicht fällbarer Eiweißbruchstücke des Hämoglobins, nach Anson.

A. Riedel, E. Wünsch und A. Hartl (32) gelang nun die Ausarbeitung einer wesentlich einfacheren, spezifischen Methode des Trypsinnachweises. Aufgrund der Tatsache, daß Trypsin die Peptidbindung an der Carboxylgruppe von Substraten angreift, die eine basische Aminosäure, also Lysin oder Arginin enthalten, stellten sie N^{α}- Benzoyl-DL-arginin-β-naphthylamid dar, aus dem durch Trypsin β-Naphthylamin abgespalten wird. Dieses wird mit Di-o-anisidin (=Echtblausalz B) gekuppelt und der so gebildete Azofarbstoff kolorimetrisch bestimmt.

Diese Methode wurde für die vorliegenden Versuche angewandt. Es sind dazu folgende Reagenzien verwendet worden:

1) 2x kristallisiertes Trypsin Worthington, das in 0,001 n HCl gelöst war, 1ml der Lösung enthielt 100γ Trypsin.

2) N^{α}- Benzoyl-DL-arginin-β-naphthylamid-hydrochlorid, je 5mg in 1,00ml Methanol gelöst. Es soll von nun an kurz "Substrat" genannt werden. (Von ihm wird durch das Trypsin β-Naphthylamid abgespalten)

3) Tris-Puffer zur Herstellung des gewünschten pH 7,8.

4) Tetrazotiertes Di-o-anisidin, das von der Firma Bayer als 2o%iges stabilisiertes Salz unter dem Namen Echtblausalz B herausgebracht wird. Es bildet mit -Naphthylamid ein Kupplungsprodukt. Eine wässrige Lösung (4 mg/ml) wird für jeden Versuch frisch bereitet.

5) Um die Farbstoffbildung zu unterbrechen muß ein saures Milieu hergestellt werden. Zu diesem Zweck wird eine 1 molare wäßrige Lösung von Trichloressigsäure (TCE) und zwar 163,4 g/l verwendet, die gleichzeitig als Eiweißfällungsmittel die vor-

handenen Eiweißstoffe beseitigt und die anschließende Extraktion mit Essigester erleichtert. Da diese Eiweißfällung beim Bauchspeichel störend wirkt, wurde für einen Teil der Versuche 3o%ige Perchlorsäure ($HClO_4$) verwendet.

6) Eine o,oo1 molare methanolische Lösung von β-Naphthylamin (14,3 mg/1oo ml) zur Aktivitätsbestimmung von Echtblausalz B.

7) Essigester zur Extraktion des Farbstoffes.

Die Extinktion wurde an einem Photometer Eppendorff bei 546 mμ Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1o mm gemessen.

Versuche mit Trypsin und Trasylol in Puffer

Testkurve für β-Naphthylamin

Da die Aktivität des Echtblausalz B ziemlich rasch abnimmt, muß sie regelmäßig geprüft werden.

Methode:
Verschiedene Mengen β-Naphthylaminlösung (enthaltend 2o - 14oγ β-Naphthylamin) werden in markierte Reagensgläser pipettiert, o,5 ml (5oγ) Trypsinlösung dazugegeben und nun mit Pufferlösung auf 5,oo ml aufgefüllt. Nun werden die Gläschen verschlossen, geschüttelt und im Thermostaten auf 37°C gebracht. Zu jedem Gläschen wird dann 1,oo ml Echtblausalz B-Lösung hinzugefügt und die Farbstoffbildung nach 3 Minuten durch Zugabe von Trichloressigsäure bzw. Perchlorsäure unterbrochen. Der Farbstoff wird in 1o,oo ml Essigester ausgeschüttelt, dekantiert und am Photometer die Extinktion gegen einen Blindwert, bei dem das β-Naphthylamin weggelassen wurde, gemessen. Erfolgt die Schichtentrennung nicht rasch genug, so kann 1-2 Minuten zentrifugiert werden.

Abbildung 1: Testkurve für β-Naphthylamin in Pufferlösung

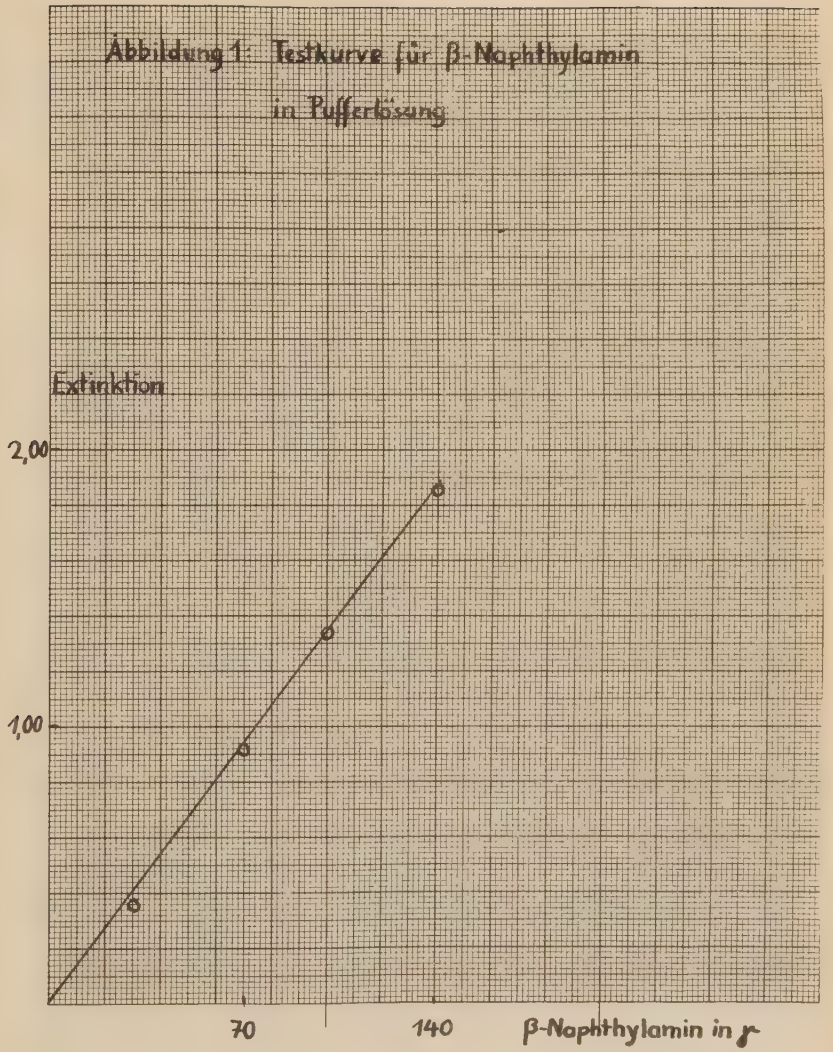


Abbildung 1: Testkurve für β-Naphthylamin in Pufferlösung

Abbildung 1 zeigt eine Testkurve für β-Naphthylamin, die sich aus den Versuchswerten ergibt. Da bei wiederholten Vergleichsversuchen zur Unterbrechung der Farbstoffbildung mit TCE bzw. $HClO_4$ mehrere gemeinsame Werte festgestellt werden können und die Differenz der Extinktion der übrigen Punkte innerhalb einer bei biochemischen Versuchen zu erwartenden Schwankungsbreite liegen, ist anzunehmen, daß die beiden Kurven den gleichen Verlauf haben, daß also die Perchlorsäure an der Reaktion nichts ändert.

Eichkurve für Trypsin

Methode:
In einige Reagensgläser werden steigende Mengen Trypsin (20-100 γ) einpipettiert, 0,5 ml Substrat hinzugegeben und mit Puffer auf 5,00 ml aufgefüllt. Von der niedrigsten und höchsten Trypsinmenge wird je ein Blindwert angesetzt, bei dem die Trypsinlösung durch 0,001 n HCl ersetzt ist. Die Röhrchen werden mit Stopfen verschlossen, geschüttelt und bei 37°C im Thermostaten 30 Minuten inkubiert. Nun wird wieder 1,00 ml Echtblausalz B hinzugefügt, nach 3 Minuten die Farbstoffbildung unterbrochen, in Essigester ausgeschüttelt, dekantiert und gegen die jeweiligen Blindwerte gemessen.

Abbildung 2: Eichkurve für Trypsin in Pufferlösung

Abbildung 2 zeigt eine Trypsineichkurve. Für jede frisch bereitete Trypsinlösung wurde eine neue Eichkurve hergestellt, da sich durch das Lagern des kristallisierten Trypsins und Fehler beim Wiegen und Lösen der sehr kleinen Enzymmengen geringe Schwankungen ergeben.

Auch hier wurde geprüft, ob die Extinktion bei Unterbrechung der Farbstoffbildung mit TCE eine andere ist als bei der mit $HClO_4$. Bei den beiden Versuchen, die in Abb. 2 dargestellt sind, ergibt sich die gleiche Kurve. Zwei weitere Parallelversuche ergaben kaum nennenswerte Unterschiede, mit denen bei biochemischen Versuchen gerechnet werden muß. Unter diesen Umständen

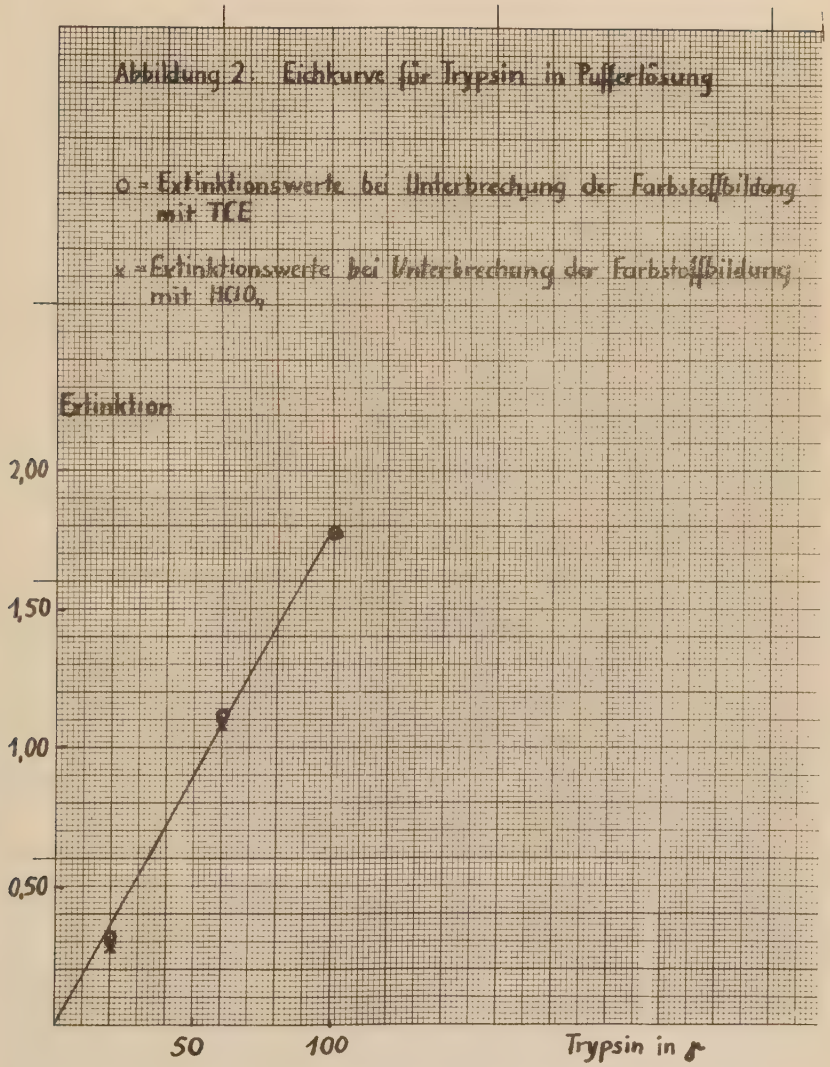


Abbildung 2: Eichkurve für Trypsin in Pufferlösung
o = Extinktionswerte bei Unterbrechung der Farbstoffbildung mit TCE
x = Extinktionswerte bei Unterbrechung der Farbstoffbildung mit $HClO_4$
Extinktion
2,00
1,50
1,00
0,50
50
100
Trypsin in γ

kann wohl angenommen werden, daß eine Änderung der Extinktionswerte durch Unterbrechung der Farbstoffbildung durch Perchlorsäure gegenüber Trichloressigsäure nicht eintritt.

Verhalten des Trypsins bei Inkubation

Um einen Anhaltspunkt für die Wirkung des Inaktivators auf die Aktivität des Trypsins zu haben, interessiert zunächst, wie Trypsin allein sich bei Inkubation verhält. Dafür wurde, wie bei allen vorliegenden Versuchen, ein Milieu von pH 7,8, wie es etwa auch im Bauchspeichel zu finden ist, und eine Temperatur von 37°C gewählt. Zur Erreichung einer möglichst großen Zuverlässigkeit der Versuchsergebnisse wurden jeweils 5o und 1oo γ Trypsin angesetzt.

Tabelle 1: Inaktivierung von Trypsin bei Inkubation

Inkubationszeit	Versuch A				Versuch B				Versuch C				Versuch D			
	5o γ		1oo γ		5o γ		1oo γ		5o		1oo γ		5o γ		1oo γ	
	a	b	a	b	a	o	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5 min.					44	6	91	9	43	7	88	12				
1o "					4o	1o	81	19	42	8	82	18				
15 "					36	14	65	35	37	13	75	25				
25 "					32	18	61	39	-	-	-	-				
3o "	21	29	43	57	29	21	58	42	3o	2o	64	36	28	22	54	46
1 Std.	15	35	26	74	22	28	4o	6o	2o	3o	41	59	18	32	35	65
2 "	6	44	14	86	6	44	12	88	8	42	16	84	1o	4o	22	78
3 "	3	47	7	93	3	47	5	95	4	46	1o	9o	-	-	-	-
4 "	2	48	3	97	2	48	3	97	2	48	3	97	5	45	1o	9o
5 "	o	5o	o	1oo	o	5o	o	1oo	o	5o	o	1oo	-	-	-	-
6 "													2	48	4	96
7 "													o	5o	o	1oo

* Zugegebene Trypsinmenge
a = nach der jeweiligen Zeit noch nachweisbare Trypsinmenge in γ
b = nach der jeweiligen Zeit inaktivierte Trypsinmenge in γ

In Tabelle 1 sind die Mengen des noch nachweisbaren und des inaktivierten Trypsins, die nach der jeweiligen Inkubationszeit festzustellen sind, für 5o und 1oo γ zugegebenes Ferment gegenübergestellt. Die Verschiedenheiten der Versuchsergebnisse sind zurückzuführen auf kleine Schwankungen in den Versuchsbedingungen wie Temperatur, pH, Fehler beim Einpipettieren, die bei den kleinen Versuchsmengen nicht zu vermeiden sind und durch die Empfindlichkeit und Kompliziertheit der Reaktion bedingt sind.

Abbildung 3: Aktivitätsabnahme von Trypsin bei Inkubation von 37°C

Um sich vom Verhalten des Trypsins ein genaueres Bild machen zu können, ist in Abbildung 3 dargestellt, welche Mengen von den ursprünglich angesetzten 1oo γ nach bestimmten Zeitabschnitten noch nachzuweisen sind.

Es ist ein zuerst sehr rascher, später langsamer werdender Aktivitätsverlust festzustellen. Nach 3o Minuten ist nur noch eine Aktivität von durchschnittlich 55% (bei den Versuchen 43-64%) nach 1 Stunde etwa 35%, nach 2 Stunden etwa 16% nachzuweisen. Bei 3 von 4 Versuchen sind nach 5 Stunden 1oo% inaktiviert, beim 4. Versuch, dessen Werte im ganzen etwas höher liegen als die der drei übrigen, ist die Aktivität erst nach 7 Stunden vollständig erloschen. Die Inaktivierung bei 5o γ Trypsin entspricht der bei 1oo γ.

Zunächst mag dieser schnelle Aktivitätsverlust überraschen, da er in der Literatur meistens viel langsamer angegeben ist. Gorini fand allerdings bei nicht mit Ca-Ionen stabilisierten Trypsinlösungen, wie im ersten Teil bereits erwähnt wurde, nach 7-8 Stunden eine vollständige Inaktivierung. Auch bei den vorliegenden Versuchen wurde die Trypsinlösung nicht stabilisiert. Außerdem ist das pH von 7,8 ziemlich alkalisch und die Temperatur von 37°C hoch, was eine rasche Inaktivierung aufgrund von

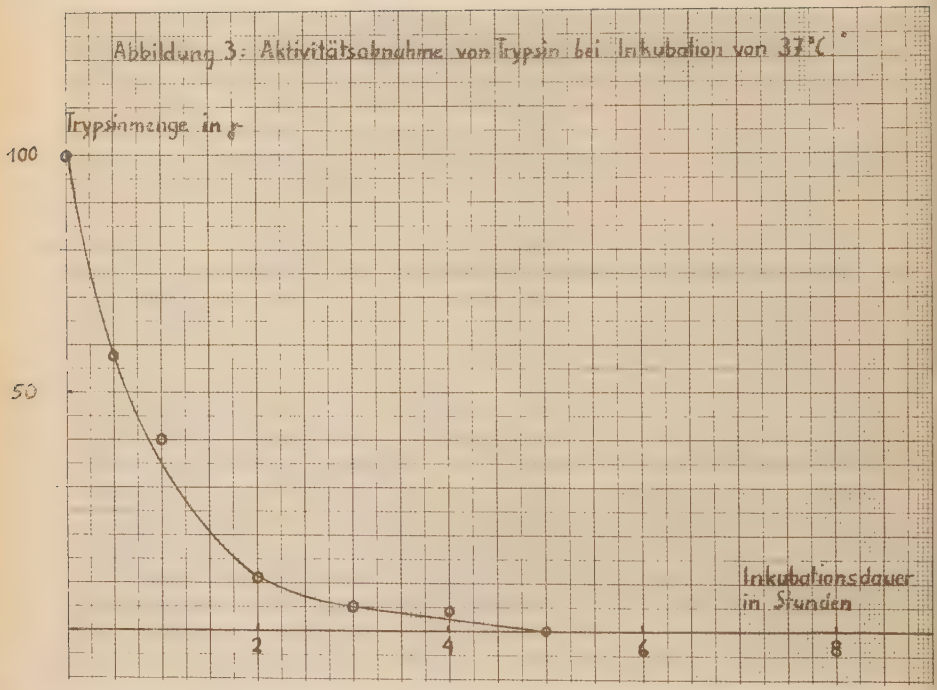


Abbildung 3: Aktivitätsabnahme von Trypsin bei Inkubation von 37°C
Trypsinmenge in %
100
50
Inkubationsdauer in Stunden
2
4
6
8

Autolyse und Bildung von inertem Eiweiß erklärt.

Da bei Inkubation des Trypsins also eine rasche Aktivitätsabnahme eintritt, bei der nach 3o Minuten nur noch etwa die Hälfte, nach durchschnittlich 5 Stunden gar keine Aktivität mehr festzustellen ist, ist es günstig für die Inaktivierungsversuche von Trypsin durch Trasylol möglichst kurze Bebrütungszeiten zu wählen. Damit wird die Selbstinaktivierung des Ferments berücksichtigt.

Inaktivierung von Trypsin durch Trasylol

Bei Inaktivierung durch Trasylol kann Trypsin vom Substrat nicht mehr so viel β-Naphthylamin abspalten, die Farbbildung wird geringer und die Extinktionswerte werden kleiner. An einer Trypsineichkurve wird nun abgelesen, welcher Trypsinmenge der gefundene Extinktionswert entspricht. Die Differenz zwischen der ursprünglich vorhandengewesenen und der gefundenen Trypsinmenge entspricht dem durch den Inhibitor bedingten Aktivitätsverlust. Auf diese Weise ist es möglich, die Wirkung des Trasylols auf das Ferment quantitiv festzustellen.

Reaktionsgeschwindigkeit der Inaktivierung

Um zu untersuchen, wieviel Trypsin nach verschiedenen Zeitabschnitten inaktiviert worden ist, wurde jeweils eine Reihe von fünf Gläschen benötigt:

a) 5oγ (o,5 ml) Trypsin + Puffer ad 5,oo ml
b) 1ooγ (1,oo ml) " + " " "
c) 5oγ " + 4o KIE[1] Trasylol + Puffer ad 5,oo ml
d) 1ooγ " + 4o KIE " + " " " .
Blindwert 1,oo ml o,oo1 n HCl + 4o KIE " + " " "

Die sonstigen Versuchsbedingungen sind wie üblich.

---

[1]) KIE=Kallikreininaktivator Einheiten

Gläschen a und b enthalten also nur Trypsin. Sie dienen zum Vergleich, wieviel Trypsin bei Inkubation durch Autolyse und andere Vorgänge inaktiviert wird. Bei Gläschen c und d sind zu den gleichen Trypsinmengen jeweils 4o KIE Trasylol zugesetzt. Diese Inaktivatormenge wurde gewählt, da in Vorversuchen festgestellt wurde, daß sie fähig ist, in 3o Minuten 5oγ Trypsin fast vollständig, 1ooγ etwa zur Hälfte zu inaktivieren.

Zum gleichen Zeitpunkt werden mehrere solche Reihen in den Thermostaten gestellt, und nach bestimmten Zeiten jeweils zu einer Substrat hinzugefügt und noch einmal 3o Minuten inkubiert. Der übrige Versuchsablauf ist wie bei der Trypsineichkurve angegeben. Auf diese Weise ist es möglich, die Größe der Inaktivierung einer konstanten Menge Trypsin durch eine konstante Menge Trasylol bei verschiedenen Inkubationszeiten festzustellen und sie mit der Inaktivierung des Ferments ohne Zusatz von Inhibitor zu vergleichen.

Tabelle 2: Versuchswerte der Inaktivierung von Trypsin bei verschiedenen Inkubationszeiten

Inkubationszeit	Versuch B				Versuch C				Versuch D			
	+ 5oγ		1ooγ		5oγ		1ooγ		5oγ		1ooγ	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Ohne Inkubation	45	o	4o	o	47	o	42	o				
5 min.	44	6	4o	9	47	7	43	12				
1o "	47	1o	42	19	48	8	41	18				
15 "	(45)	14	43	35	(46)	13	45	25				
23 "	47	18	42	39	(45)	16	(41)	33				
3o "	(41)	21	(4o)	42	48	2o	55	36	46	22	59	56
1 Stunde	(42)	28	-	-	48	3o	(51)	59	46	32	(54)	65
2 "	49	44	59	88	5o	42	56	84	5o	4o	58	78
3 "	5o	47	(56)	95	5o	46	(6o)	9o	-	-	-	-
4 "	5o	48	58	97	5o	48	55	97	5o	45	65	9o
5 "	5o	5o	58	1oo	5o	5o	57	1oo	-	-	-	-
6 "	-	-	-	-	-	-	-	-	5o	48	72	96
9 "											8o	1oo
11 "											82	1oo
15 "											8o	1oo
18 "											8o	1oo
24 "											85	1oo

+) = zugegebene Trypsinmenge
a = inaktivierte Trypsinmenge in γ bei Zugabe von 4o KIE Trasylol
b = inaktivierte Trypsinmenge in γ bei Inkubation von Trypsin allein

Abbildung 4: Inaktivierung von 1oo γ Trypsin durch 4o KIE Trasylol bei verschiedenen Inkubationszeiten

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß bei Zugabe von verhältnismäßig viel Inhibitor (5o γ Trypsin : 4o KIE) die Inaktivierung schnell erfolgt. Selbst bei gleichzeitiger Zugabe von Substrat sind durchschnittlich 45 γ (also 9o%) nicht mehr nachweisbar. Das ist entweder darauf zurückzuführen, daß die Reaktion innerhalb der zum Einpipettieren des Substrats notwendigen Zeit (also Sekunden) vor sich geht, oder in einem Gemisch, in dem Trypsin, Trasylol und Substrat enthalten sind, das Ferment zu seinem Inhibitor eine weit größere Affinität hat als zum Substrat. Während der 3o Minuten Inkubationszeit, die zum Andauen des Substrats notwendig sind, geht dann die Reaktion zwischen Trypsin und Trasylol weiter, die Abspaltung des β-Naphthylamins dagegen tritt zurück. Es ist jedoch anzunehmen, daß die starke Inaktivierung innerhalb kurzer Zeit auf eine sehr große Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen ist, da im zweiten Fall die Menge des gehemmten Trypsins bei Verlängerung der Inkubationszeit vor Zugabe von Substrat deutlicher steigen müßte. Es ist aber bei 3o Minuten Inkubation von Trypsin + Trasylol vor Zugabe von Substrat kaum eine Änderung der Versuchsergebnisse zu beobachten, während das gleichzeitig angesetzte Trypsin ohne Trasylol eine ständig zunehmende Inaktivierung zeigt. Erst bei 1-2stündigem Stehenlassen des Ansatzes mit Inhibitor im Thermostaten ist von 5o γ Trypsin nichts mehr nachzuweisen.

Auch wenn sich das Verhältnis Trypsin : Inaktivator mehr nach der Seite des Trypsins verschiebt, ist zu beobachten, daß die durch das Trasylol verursachte Inaktivierung offenbar sehr schnell vor sich geht, wahrscheinlich in den ersten Minuten nach Zugabe des Inhibitors. Bei einem Verhältnis von 1oo γ Trypsin : 4o KIE Trasylol werden bei gleichzeitiger Zugabe von Trasylol und Substrat 4o - 42 γ Trypsin (also 4o-42%) inaktiviert. Inkubiert man das Ferment-Inaktivator-Gemisch vor Zugabe von Substrat ver-

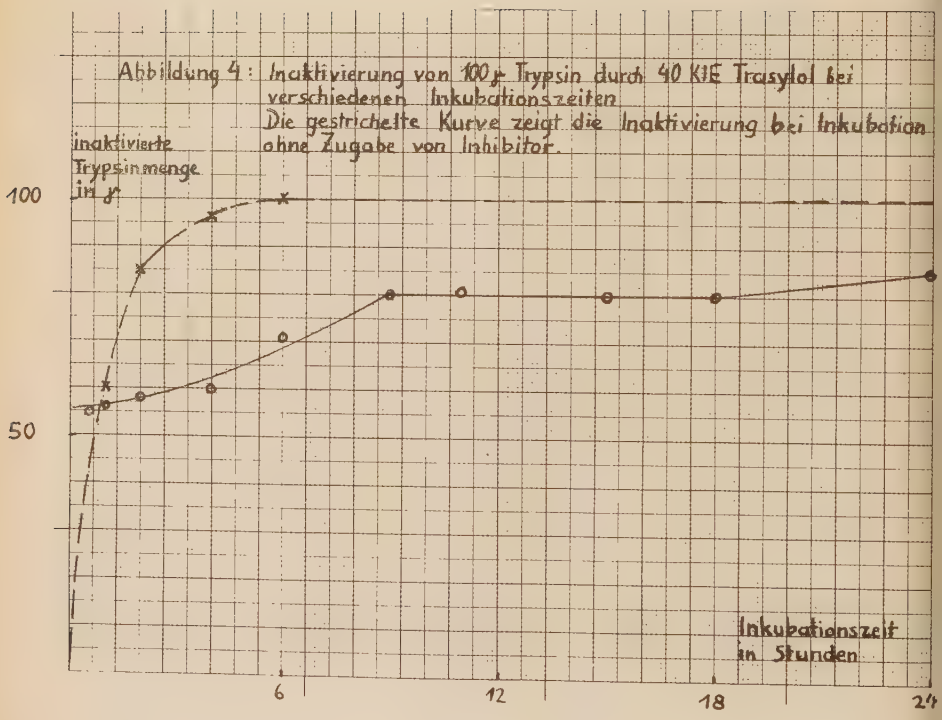


Abbildung 4: Inaktivierung von 100 γ Trypsin durch 40 KIE Trasylol bei verschiedenen Inkubationszeiten
Die gestrichelte Kurve zeigt die Inaktivierung bei Inkubation ohne Zugabe von Inhibitor.

schiedene Zeiten, so ist noch eine sehr langsame Zunahme des Aktivitätsverlustes feststellbar. So konnte nach 3o Minuten Einwirkungszeit nachgewiesen werden, daß etwa 55γ (die Versuchswerte schwanken zwischen 4o und 59γ, was wieder auf die Empfindlichkeit und Kompliziertheit der Reaktion zurückzuführen ist) gehemmt worden sind. Nun tritt etwas Bemerkenswertes ein: Während bei Bebrütung einer Trypsinlösung allein deren Aktivität ständig abnimmt und nach 5-7 Stunden vollständig erloschen ist, ist in einem Trypsin-Trasylol-Gemisch nach Erreichen einer bestimmten Inaktivierung kaum noch ein Aktivitätsverlust feststellbar. Bei Versuch B und C, bei denen nach 5 Stunden die reine Trypsinlösung inaktiv geworden ist, sind nach der gleichen Zeit bei Gegenwart des Inhibitors erst 57-58γ Trypsin gehemmt, es ist also noch eine Aktivität von 42-43γ (Trypsin) nachzuweisen. Bei Versuch C wurden die Versuche bis zu 24 Stunden Inkubation fortgesetzt. Hier liegen zwar die Inaktivierungswerte von vornherein etwas höher - so sind nach 4 Stunden schon 65γ nicht mehr nachweisbar - es ist aber von 9 Stunden (8oγ) bis 24 Stunden (85γ) die Aktivität kaum geringer geworden.

Aus den vorliegenden Versuchen geht also hervor:

a) daß die Reaktionsgeschwindigkeit für die Inaktivierung von Trypsin durch den Inaktivator (Trasylol) sehr groß ist.

b) daß bei Einwirken einer ungenügenden Inhibitormenge auf das Ferment dasjenige Trypsin, das nicht mehr vom Inaktivator gehemmt wird, stabilisiert wird.

c) daß zur vollständigen Inaktivierung ein hoher Inhibitorgehalt des Gemisches notwendig ist, sonst tritt Stabilisierung ein.

Wenn es auch in vivo gilt, daß bei einer zu geringen Inaktivatorkonzentration gegenüber dem Enzym der Inhibitor stabilisierend wirkt, so würde das die von der Klinik gestellte Forderung nach der Anwendung großer Trasylolmengen zur Therapie der Pankreaserkrankungen rechtfertigen und erklären.

Größe der Inaktivierung bei Einwirken verschiedener Mengen Trasylol auf eine konstante Menge Trypsin

Da wir gesehen haben, daß die Geschwindigkeit dieser Reaktion groß ist, ist es günstig, kurze Inkubationszeiten zu wählen. Der dabei gemessene Aktivitätsverlust dürfte allein auf die Wirkung des Inhibitors zurückzuführen sein, so daß eine eventuelle Selbstinaktivierung des Trypsins nicht berücksichtigt zu werden braucht.

Die Versuche werden folgendermaßen durchgeführt:

Zu einer Reihe von Gläschen mit 1oo bzw. 5oγ Trypsin werden steigende Mengen (2o - 9o KIE) Trasylol hinzugefügt, mit Tris-Puffer auf 5,oo ml aufgefüllt, geschüttelt und 3o Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wird o,5 ml Substratlösung zugesetzt. Der weitere Versuchsablauf ist wie üblich. Aus der Eichkurve für Trypsin kann nun wieder anhand der gefundenen Extinktionswerte die noch vorhandene Aktivität abgelesen werden. Die Differenz zwischen der ursprünglich vorhandengewesenen Trypsinmenge und der noch nachweisbaren entspricht der Inaktivierung durch Trasylol.

Tabelle 3: Beispiele für die Inaktivierung einer konstanten Menge von 1ooγ Trypsin durch verschiedene Mengen Trasylol (zugleich %).

Versuch	Gefundene Inaktivierung in γ bei der jeweils zugegebenen Trasylolmenge						
	3o KIE	4o KIE	5o KIE	6o KIE	7o KIE	8o KIE	9o KIE
1	43	56	64	-	86	93	1oo
2	48	5o	6o	64	74	98	1oo
3	48	59	65	75	86	88	1oo
4	53	64	71	72	85	96	1oo
5	53	57	65	8o	85	91	1oo
6	-	-	6o	74	88	1oo	1oo
7	-	-	59	73	87	98	1oo
Durchschnittswerte	49	58	63	73	84	95	1oo
Inaktivierungsfähigkeit pro 1 KIE	1,6 γ Trypsin	1,4 γ	1,2-1,3 γ	1,2 γ	1,2 γ	1,2 γ	

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß nach 3o Minuten Inkubation 1oo γ Trypsin von 9o KIE Trasylol vollständig inaktiviert werden. Durch 8o KIE werden durchschnittlich 95 %, durch 7o KIE 84 %, durch 6o KIE 73 % und durch 5o KIE 63 % unwirksam gemacht. Das heißt, daß bei einem Verhältnis von 1oo γ Trypsin:5o bis 8o KIE Trasylol (= 2:>1) 1 Einheit des Inaktivators fähig ist, 1,2 γ Trypsin zu hemmen.

Sinken die Trasylolmengen pro 1oo γ Trypsin unter 5o Einheiten (also Verhältnis 2:<1) ab, dann steigt die Menge des inaktivierten Ferments im Verhältnis an. So wurde bei Zugabe von 4o KIE eine durchschnittliche Hemmung von 58 % und bei 3o KIE von 49 % gefunden. Das entspricht einer Inaktivierungsfähigkeit von 1,4 γ (bei 4o Einheiten) und von 1,6 γ Trypsin (bei 3o Einheiten) pro 1 KIE Trasylol.

Abbildung 5: Inaktivierung einer konstanten Menge Trypsin (1oo γ) durch verschiedene Mengen Trasylol.

Entsprechende Verhältnisse werden bei Einwirken von 2o-5o Einheiten Inhibitor auf 5o γ Trypsin gefunden.

Tabelle 4: Beispiele für die Inaktivierung einer konstanten Menge von 5o γ Trypsin durch verschiedene Mengen Trasylol.

Versuch	Gefundene Inaktivierung in γ Trypsin bei der jeweils zugegebenen Trasylolmenge			
	2o KIE	3o KIE	4o KIE	5o KIE
1	28	4o	46	5o
2	28	38	48	5o
3	32	39	47	5o
4	32	4o	5o	5o
5	3o	4o	48	5o
6	29	39	47	5o
7	32	43	5o	5o
8	31	4o	5o	5o
9	34	41	5o	5o
Durchschnittwerte	31	4o	49	5o
Prozent	62	8o	98	1oo
Inaktivierungs-fähigkeit pro 1 KIE	1,5 γ Trypsin	1,3 γ	1,2 γ	

Abbildung 5: Inaktivierung einer konstanten Menge Trypsin (100 γ) durch verschiedene Mengen Trasylol

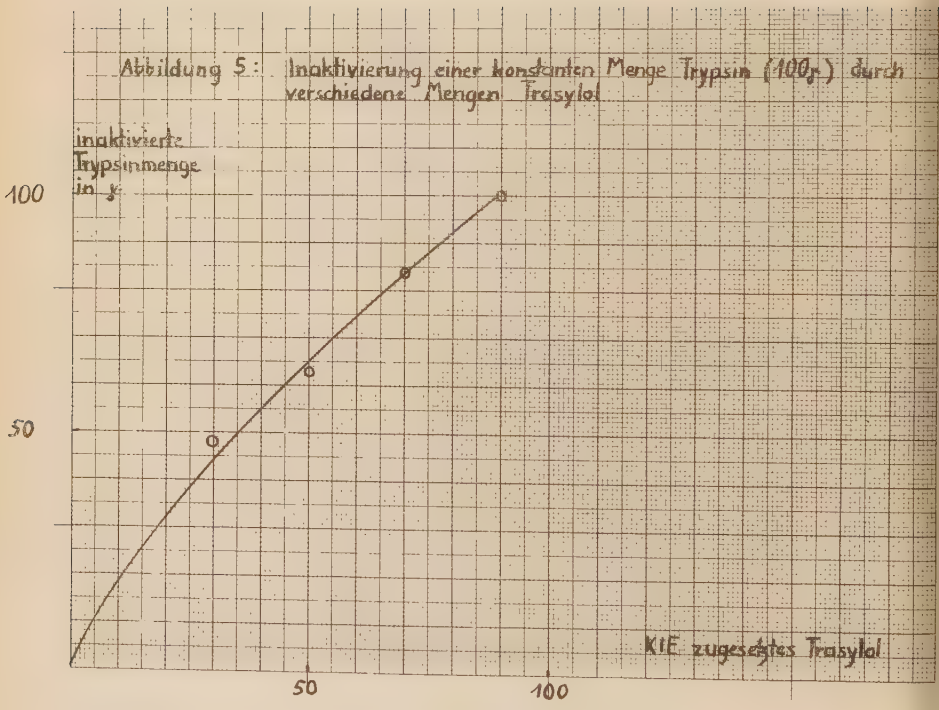
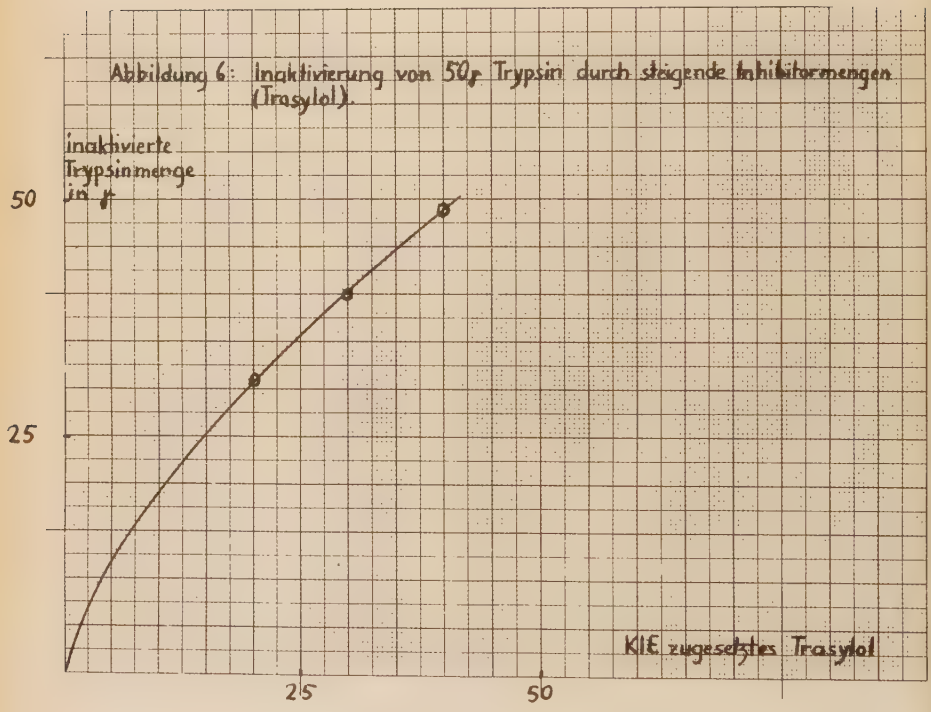


Abbildung 6: Inaktivierung von 50γ Trypsin durch steigende Inhibitormengen

Hier liegen die Werte für die Inaktivierungsfähigkeit etwas höher, was vielleicht auf die Fehler, die durch die kleinen Versuchsmengen entstanden sind, zurückzuführen ist. Bei Einwirken auf 50γ des Ferments hat 1 KIE eine Hemmfähigkeit von 1,2γ Trypsin bei einer Trasylolmenge von 40 Einheiten (entspricht 100γ : 80 KIE), von 1,3γ bei 30 Einheiten (entspricht 100γ : 60 KIE) und von 1,5γ bei 20 Einheiten (entspricht 100γ : 40 KIE).

Diese verhältnismäßig hohen Werte bei Zugabe von geringen Trasylolmengen dürften nicht allein auf die Wirkung des Inhibitors zurückzuführen sein. Es ist ja nicht anzunehmen, daß bei einer Abnahme der Konzentration des Inhibitors gegenüber der des Enzyms eine vermehrte Inaktivierung eintritt. Man würde eher umgekehrt erwarten, daß von einer gegenüber Trasylol verhältnismäßig grossen Menge Trypsin weniger inaktiviert wird als von einer verhältnismäßig kleinen. In Tabelle 2 ist diese Erwartung bestätigt, wenn man die Versuchsergebnisse bei 5 Minuten, 10 Minuten und ohne Inkubation vor Zugabe von Substrat (Spalte a) betrachtet. Hier ist die Selbstinaktivierung des Trypsins ohne Trasylolzusatz noch gering. Erst wenn in diesem Parallelversuch (Spalte b) die Selbstinaktivierung des Trypsins erheblich steigt, nimmt die Menge des inaktivierten Trypsins bei Zusatz einer Inaktivatormenge, die nicht imstande ist, das Ferment vollständig zu hemmen, langsam zu und kommt erst nach etwa 2 Stunden zum Stillstand. Das läßt darauf schließen, daß es sich bei diesem späteren Aktivitätsverlust um eine Wärmeinaktivierung handelt und nicht mehr um Trasylolwirkung, denn wäre er auf die Wirkung des Inhibitors zurückzuführen, dann müßte die Inaktivierung bei Vorhandensein einer im Verhältnis größeren Trasylolmenge sogar stärker ansteigen als bei Gegenwart einer kleineren Menge. Vielleicht ist diese Wärmeinaktivierung auf die Bildung von inertem Eiweiß bis zur Erreichung eines Gleichgewichts mit aktivem Trypsin zurückzuführen, während die Lösung gegen Autolyse, bei der durch ständige Selbstverdauung das Gleichgewicht immer wieder hergestellt werden muß, stabilisiert ist.

Abbildung 6: Inaktivierung von 50γ Trypsin durch steigende Inhibitormengen (Trasylol).



Damit ist wieder die große Reaktionsgeschwindigkeit der Trypsininaktivierung auch bei Vorhandensein von weniger als 5o KIE Trasylol auf 1oo γ Trypsin, also bei Überwiegen des Ferments, bestätigt. Natürlich ist zu berücksichtigen, daß bei Abnahme der Konzentration der Reaktionspartner auch die Geschwindigkeit der Reaktion abnimmt.

Die günstigste Zeit zur Untersuchung dürfte bei 15 Minuten Voriinkubation liegen, bei der die Versuchswerte in Tabelle 2 bei Einwirken einer konstanten Menge Trasylol auf verschiedene Trypsinmengen einigermaßen ausgeglichen erscheinen. Wenn wir annehmen, daß zu dieser Zeit die Inaktivierung nur auf den Inhibitor, gleich in welchem Verhältnis er zum Ferment steht, zurückzuführen ist, die gefundene Inaktivierung also der wahren Inaktivierungsfähigkeit des Trasylol entspricht, so besitzt 1 KIE Trasylol die Fähigkeit, 1,2 γ Trypsin zu inaktivieren (da 4o KIE von 1oo γ Trypsin durchschnittlich 46 γ hemmen). Das würde in gewissen Grenzen (bei nicht zu kleinen Ferment- und Hemmkörpermengen und nicht zu großen Mengenunterschieden der beiden Reaktionspartner) auch Rückschlüsse bei Zugabe unbekannter Inaktivatormengen erlauben.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß nach 3o Minuten Inkubation 9o KIE Trasylol 1oo γ Trypsin vollständig inaktivieren. Läßt man 5o KIE auf 1oo γ einwirken, so ist ein Aktivitätsverlust von 63 γ festzustellen. Bei kleineren Inhibitormengen gegenüber der gleichen Menge Trypsin wird im Verhältnis mehr Ferment gehemmt, was aber wahrscheinlich auf eine Wärme-Inaktivierung desjenigen Trypsins, zu dessen Inaktivierung die zugegebene Trasylolmenge nicht mehr ausreichte, zurückzuführen ist.

Untersuchungen am Sekret einer Pankreasfistel

Durch die Ausbildung einer Bauchspeichelfistel nach einer Pankreassequestrotomie bot sich Gelegenheit, mit Pankreassekret zu experimentieren. Bei der Anwendung der Methode zur Trypsinbestimmung im Fistelsekret ergaben sich erhebliche Schwierig-

keiten, die erst überwunden werden mußten. Der erste Teil der Versuche galt deshalb der Modifizierung der Methode bei Verwendung von Pankreassaft. Dann konnte darangegangen werden, das Sekret bezüglich seiner Bestandteile und seines Trypsingehaltes bzw. seiner Inaktivierungsfähigkeit zu untersuchen. Auch sollte die Wirkung von Trasylolgaben auf den Pankreassaft festgestellt werden.

Bei den Versuchen mit dem Pankreassekret konnte nicht so planmäßig vorgegangen werden, wie bei den Versuchen mit Trypsin in vitro, da sein Trypsingehalt ständig wechselte, nur begrenzte Mengen der jeweiligen Sekret-Portion mit der gleichen Trypsinkonzentration zur Verfügung standen und die Zeit wegen der verhältnismäßig kurzdauernden Sekretabsonderung durch die Fistel knapp war.

Krankengeschichte

Bei der 58jährigen Patientin treten seit einer Gallenblasenentzündung vor 13 Jahren immer wieder Schmerzen im rechten Oberbauch auf. Sie wird nun stationär aufgenommen, da sich seit 3 Tagen plötzlich heftige, kolikartige Schmerzen im rechten Oberbauch mit Übelkeit und Erbrechen einstellten. Der Stuhl ist grau, der Urin braun. Die adipöse Patientin ist bei Klinikaufnahme in reduziertem Allgemeinzustand. Das Abdomen ist überall druckschmerzhaft, besonders im Hypogastrium, es zeigt aber keine Abwehrspannung. Der rechte Rippenrand ist klopfempfindlich, die Leber 2 Querfinger vergrößert. Die Serumdiastase ist 64 WE, die Harndiastase 1o24 WE.

Neben den üblichen Behandlungsmethoden wird sofort Trasylol infundiert und zwar am 1. Tag 24ooo KIE, am 2. und 3. Tag 16ooo KIE und schließlich 1oooo bzw. 6ooo Einheiten. Da sich das Allgemeinbefinden erneblich gebessert hat und die Harndiastase auf normale Werte abgesunken ist, wird nun, drei Wochen nach der Klinikaufnahme eine Laparatomie unter Trasylolschutz vorgenommen. Dabei werden bei bestehender chronischer Cholecystitis und Cholelithiasis Zeichen akuter Pankreasnekrose festgestellt und ein Pankreassequester von 15 cm Länge entfernt. In das Leberbett und die

Bursa omentalis wird ein Drain eingelegt. Unter der Infusionsbehandlung mit Trasylol, die am 1. Tag post op. mit 20000 E, am 2. und 3. mit 10000 E und bis zum 12. Tag mit 6000 E fortgesetzt wird, erholt sich die Patientin gut. Aus dem Drain entleert sich ein zunächst trübes, später klar werdendes Sekret, das die Fähigkeit zeigt, die Wundränder anzudauen. Da sich ständig etwa die gleiche Menge Sekret aus der Fistel absondert, wird schließlich (etwa 8 Wochen post op.) das Drain entfernt und 6 Tage lang 8000 E Trasylol direkt in die Fistel injiziert. Nach diesen lokalen Inaktivatorapplikationen stellt die Patientin zwar leichte Übelkeit fest, die ausgeschiedene Sekretmenge geht aber deutlich zurück und die Fistel schließt sich. 11 Wochen nach der Operation wird die Patientin ohne Beschwerden und mit verheilter Fistel entlassen. Die Serumwerte sind jetzt normal, die Harndiastase 64 WE.

Untersuchungen des Fistelsekrets auf seine Bestandteile

Das durch die Fistel abfließende Sekret stellt nur einen geringen Teil der insgesamt produzierten Menge dar, da die Hauptmenge durch den Speichelgang ins Duodenum abfließen kann. Außerdem hat die Patientin keine strenge Bettruhe. Durch Lageveränderungen, Verschiebungen des Drains und Abfließen des Sekrets neben dem Drain in den Verband ist daher die Menge des Sekrets erheblichen Schwankungen und Ungenauigkeiten unterworfen.

Nach anfänglichem Abfließen eines schmutzig graubraunen Wundsekrets mit Gewebsbröckeln wurde die abgesonderte Flüssigkeit allmählich klarer und schließlich wasserklar mit fadem Geruch.

Nun wurde mit den Versuchen begonnen.

Mit den im Labor der Klinik üblichen Methoden wurde in verschiedenen Portionen [+] des Pankreassekrets zunächst Folgendes nachgewiesen:

Rest N	10 mg%
Kochsalz	415-450 mg%

[+] (es handelte sich bei diesen Portionen zunächst um die während 24 Stunden aufgefangene Tagesmenge des Bauchspeichels. Später wurde das Sekret von kürzeren Zeiträumen aufgefangen. Die genauen Zeitangaben für die Sekretionsdauer der einzelnen Bauchspeichelportionen ist aus Tabelle 5 ersichtlich).

Gesamteiweiß	o,4-o,55 %
Albumin	Ø
Thymoltest	D% 66 (+) bis 68 (+)
saure Phosphatase	3,7 E
alkal. Phosphatase	3,7 - 1o,5 E
pH	7,8

Nun sollte festgestellt werden, ob das Sekret der Fistel überhaupt aktives Trypsin enthält. Dazu wurden a) 1,oo b) 2,oo und c) 3,oo ml BSp mit o,5 ml Substrat versetzt, auf 5,oo ml mit Puffer aufgefüllt und 3o Minuten bei 37°C inkubiert. Ein Blindwert mit 1,oo ml Pankreassekret (Blw a) und einer mit 3,oo ml BSp aber ohne Substrat (Blw c) sowie ein Blindwert ohne Bauchspeichel aber mit Substrat (Blw 1) liefen unter den gleichen Bedingungen mit. Der übrige Versuchsablauf entspricht dem bei den Trypsinversuchen in Puffer beschriebenen.

Die Extinktionswerte dieses Versuches waren bei allen Ansätzen, die Bauchspeichel enthielten, ziemlich hoch und zwar desto höher, je mehr Sekret sie enthielten. Der Blindwert, der zwar Sekret, aber kein Substrat enthielt (Blw a und Blw c), bei dem also keine Abspaltung von β-Naphthylamin vom Substrat durch Trypsin möglich gewesen war, zeigte den gleichen Extinktionswert wie der entsprechende Versuch mit Substrat. Daraus ist zu schließen, daß die hohen Extinktionswerte nicht auf ein Vorhandensein von aktivem Trypsin in diesem Sekret zurückzuführen ist, sondern wahrscheinlich auf andere farbbildende Komponenten wie Tyrosinkörper und dergleichen.

Am 1. Versuchstag konnte also kein aktives Trypsin im BSp festgestellt werden, weder unmittelbar nach dem Abfangen des Sekrets noch nach 9 Stunden, 24 Stunden oder 48 Stunden Aufbewahren bei Zimmertemperatur.

Um das Sekret auch noch mit einer anderen Methode auf seine proteolytische Wirkung zu prüfen, wurden auf einen Filmstreifen Löschpapierstreifen gelegt, die

a) mit einer Lösung, bei der 2,oo ml BSp mit Tris-Puffer auf 5,oo ml aufgefüllt waren

b) mit reinem BSp

c) mit 1o/ Trypsin in 5,oo ml Puffer

getränkt waren.

Nach 3o Minuten und auch später zeigten a und b keine Andauung der Gelatineschicht des Filmstreifens, während bei c eine Andauung festzustellen war.

Die Portion Pankreassekret, die am 2. Tag aufgefangen wurde, wurde nach der gleichen Methode auf aktives Trypsin untersucht wie die vorige, Bei diesem Versuch waren die Extinktionswerte von a und c erheblich höher als die entsprechenden Blindwerte, nämlich a= o,32o Blw a = o,o8o

c= o,725 Blw c = o,17o

Daraus ist zu schließen, daß die größere Extinktion bei den Versuchsansätzen, die Substrat enthalten, auf eine Abspaltung von β-Naphthylamin von demselben zurückzuführen ist, daß also im Pankreassekret aktives Trypsin enthalten war, das diese Abspaltung bewirkt. Es ist also in dieser BSp-Portion aktives Trypsin nachgewiesen worden.

Der quantitative Nachweis von Trypsin im Pankreassekret

Bei den ersten Untersuchungen des Pankreassaftes auf Trypsin wurde die Unterbrechung der Farbstoffbildung mit Trichloressigsäure vorgenommen. Dabei bildete sich durch den Eiweißgehalt des BSp ein Niederschlag, der sich beim Zentrifugieren zur Schichtentrennung als fester, rötlicher Ring zwischen den beiden Schichten absetzte und zwar war das Rot desto intensiver, je mehr Trypsin der Ansatz enthielt. Es muß also durch den Niederschlag auch ein Teil des gebildeten Azofarbstoffes mitgerissen worden sein. Deshalb wurde ein Reagens gesucht, das kein Eiweißfällungsmittel wie die Trichloressigsäure ist und doch das zur Unterbrechung der Farbstoffbildung notwendige saure Milieu herstellt. Diese Bedingungen erfüllt die Perchlorsäure ($HClO_4$). Bei Verwendung derselben bei Gegenwart von Pankreassekret wurden wesentlich höhere Extinktionswerte gemessen als bei Verwendung von Trichloressigsäure (TCE). Ein Vergleich der Eichkurven für Trypsin

in Puffer bei Unterbrechung der Farbbildung mit TCE bzw. $HClO_4$ hat etwa gleich hohe Extinktionswerte ergeben, d.h. daß der wesentliche Vorgang der Reaktion nicht durch $HClO_4$ verändert wird (siehe dort). Wenn nun bei Gegenwart von Pankreassekret die Extinktion bei Anwendung von $HClO_4$ höher ist als bei TCE, so dürfte das auf die Ausschaltung der Eiweißfällung zurückzuführen sein.

Um die Einflüsse des Pankreassekrets auf das Trypsin und auf die Reaktion der Nachweismethode zu berücksichtigen (z.B. Bindung des Trypsins oder des Farbstoffs an die Bestandteile des BSp usw), wurde eine Eichkurve für β-Naphthylamin und für Trypsin bei Vorhandensein verschiedener Mengen Pankreassaftes angelegt. Es wurde BSp benützt, der aktives Trypsin enthält, da bei inaktivem Pankreassaft ein Inaktivatorüberschuß vorhanden sein könnte, der das zugefügte Trypsin inaktivieren und so ein falsches Bild ergeben würde.

Die Testkurve für β-Naphthylamin in Pankreassaft, der aktives Trypsin enthält

wurde folgendermaßen angelegt:
In eine Reihe von Reagensgläsern wird je 1,oo ml BSp gefüllt, steigende Mengen β-Naphthylamin (2o-14oγ) dazugegeben, mit Tris-Puffer auf 5,oo ml aufgefüllt und auf 37°C gebracht. 1 Glas läuft als Blindwert ohne β-Naphthylamin mit. Der weitere Versuchsablauf ist wie bei Anlegen einer Testkurve für β-Naphthylamin in reiner Pufferlösung. Dieselbe Versuchsreihe wird mit 2,oo ml und 3,oo ml BSp durchgeführt.

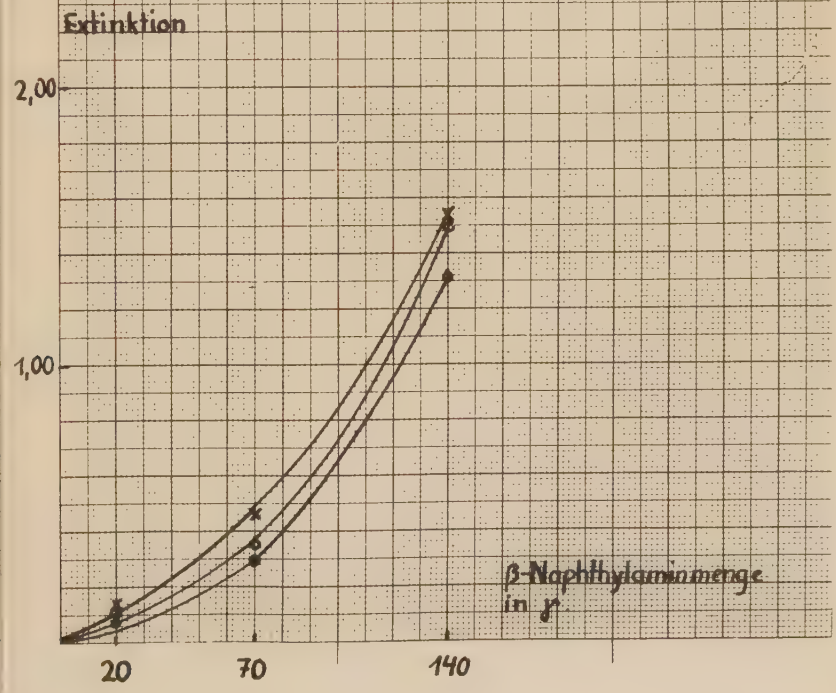
Abbildung 7: Testkurven für β-Naphthylamin in aktivem Pankreassekret.

Durch Abzug des Blindwertes ergibt sich die Extinktion, die durch Kupplung von β-Naphthylamin mit Echtblausalz B verursacht ist.

Aus den Kurven in Abb. 7 ist ersichtlich, daß mit steigender Menge Pankreassekret die Extinktion für eine bestimmte zugegebene Menge β-Naphthylamin absinkt. So ergeben

Abbildung 7: Testkurven für β-Naphthylamin in Pankreassaft, der aktives Trypsin enthält.

x = Werte in 1ml Pankreassaft
o = " " 2 ml "
● = " " 3 ml "



z.B. 7oγ β-Naphthylamin in 1,oo ml BSp einen Extinktionswert (E) von o,42o, in 2,oo ml ist E= o,355, in 3,oo ml ist E = o,295. Die Werte bei Zugabe einer bestimmten β-Naphthylaminmenge bei gleichbleibender Menge BSp bilden keine Gerade wie in reiner Pufferlösung, sondern sie steigen bei zunehmender β-Naphthylaminmenge erheblich an. Das läßt darauf schließen, daß β-Naphthylamin oder eine andere Komponente der Versuchsanordnung an Eiweiß oder einen anderen Bestandteil des Pankreassaftes gebunden wird und so nicht mehr durch Farbbildung erfaßt wird. Wenn nun das β-Naphthylamin gegenüber BSp zunimmt, wird eine verhältnismäßig kleinere Menge davon an den Pankreassaft gebunden, es steht eine größere Menge zur Farbstoffbildung zur Verfügung und die Extinktion wird erheblich größer. Bei Zunahme des Pankreassekrets gegenüber einer gleichbleibenden Menge β-Naphthylamin wird verhältnismäßig mehr davon an BSp gebunden, die Extinktion wird geringer. Für die

Eichkurve für Trypsin in Pankreassaft, der aktives Trypsin enthält

wurde in eine Reihe von Reagensgläsern 1,oo ml BSp pipettiert, steigende Mengen Trypsinlösung (2o - 1oo γ) hinzugegeben (außer in ein Glas, das als Blindwert mitläuft und in das statt des Trypsins 1,oo ml o,oo1 n HCl gegeben wird), mit Tris-Puffer auf 5,oo ml aufgefüllt und der Ansatz 3o Minuten in den Thermostaten gestellt. Schließlich wird überall o,5 ml Substrat zugefügt, die Gläschen verschlossen und nochmals bei 37°C 3o Minuten inkubiert. Der weitere Versuchsablauf ist wie bei der Eichkurve für Trypsin in Puffer. Dasselbe wurde mit 3,oo ml BSp durchgeführt. Die Unterbrechung der Farbstoffbildung erfolgte, wie bereits besprochen, mit $HClO_4$.

Abbildung 8: Eichkurve für Trypsin in aktivem Bauchspeichel.

Auch hier wird von den gemessenen Extinktionswerten der Blindwert abgezogen. Damit ist das im Bauchspeichel enthaltene aktive Trypsin und die Bildung anderer Farbstoffe berücksichtigt und der erhaltene Wert entspricht der Extinktion des zugegebenen Trypsins bei Gegenwart der jeweiligen Menge Pankreassekret.

Wie bei der Testkurve für β-Naphthylamin,so ist auch bei der für Trypsin ein geringer Unterschied der Extinktionswerte bei Ver-

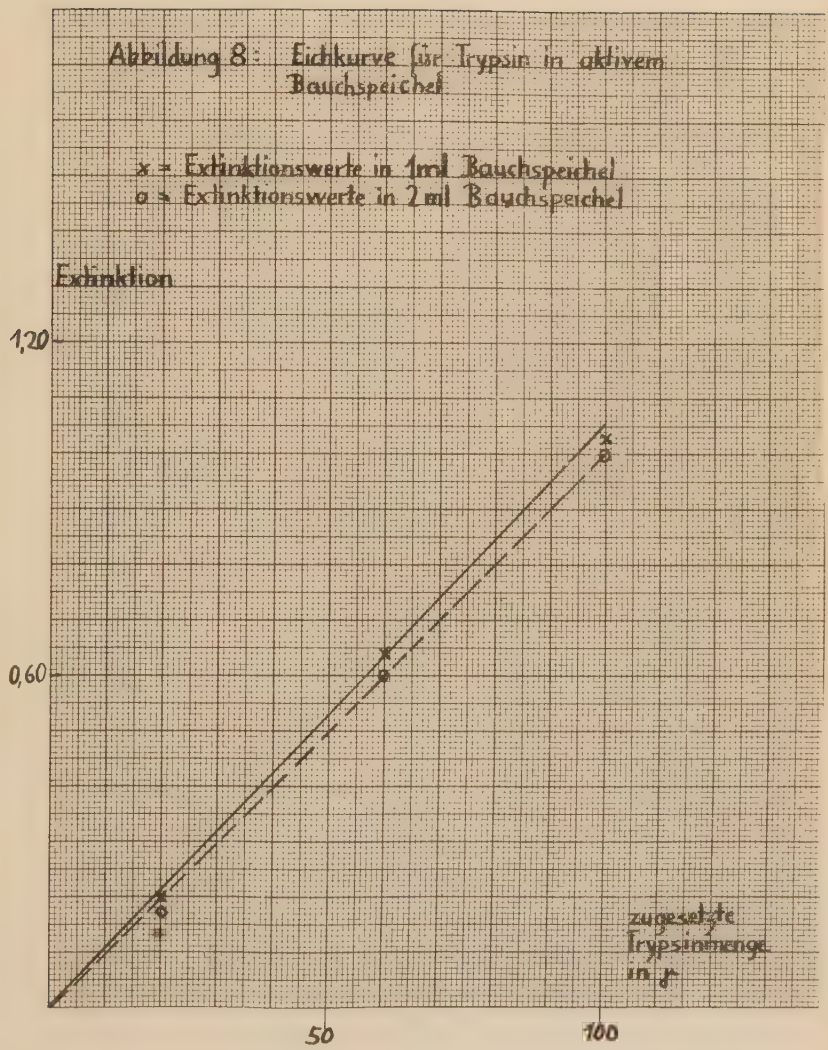


Abbildung 8: Eichkurve für Trypsin in aktivem Bauchspeichel
x = Extinktionswerte in 1ml Bauchspeichel
o = Extinktionswerte in 2ml Bauchspeichel
Extinktion
1,20
0,60
50
100
zugesetzte Trypsinmenge in γ

wendung verschiedener Mengen BSp bei gleichen Mengen des Enzyms zu bemerken, und zwar ist bei einer größeren Menge BSp bei gleichbleibender Trypsinmenge die Extinktion geringer. Das läßt wieder auf die Bindung einer Komponente der Versuchsanordnung an das Pankreassekret schließen. Die Werte bei gleichbleibender Pankreassaft- und steigender Trypsinmenge ergeben eine Gerade.

Allgemeine Untersuchungen am Sekret der Pankreasfistel

Tabelle 5: Allgemeine Untersuchungen am Pankreassekret

Tag	Zeit	Menge (ml)	Trypsingehalt (γ ml)	Diastasegehalt (WE)	Flammenphotometerwerte (mval) Ca	Na	K	Sediment Bakterien	Leuko
1-2	8^{00}- 8^{00}	34	0	-	-			-	
2-3	9^{00}- 8^{00}	-	33	16384	o,7	14o	5,45	++	1-2
3	8^{00}-12^{00}	4o	113	-	-			-	
3-4	12^{00}-12^{00}	12o	21	8192	1,25	165	6,1	++	1
4-5	12^{00}-12^{00}	12o	o	8192	1,1o	156	5,7	+	1
5-6	12^{00}- 8^{00}	1oo	0	8192	o,6	149	5,o	++	8-1o
6	8^{00}-12^{00}	4o	4o	8192	1,1o	123	4,1	++	8
6-7	12^{00}-12^{00}	-	44	32768	o,8	136	4,3	++	einzelne
7-8	12^{00}-12^{00}	13o	0	32768	o,8	136	4,5	++	einzelne
8-9	12^{00}-12^{00}	114	0	32768	o,9	14o	4,5	+	zahlreich
9-1o	12^{00}-12^{00}	11o	15	32768	o,9	142	4,4	-	
1o-11	12^{00}-12^{00}	12o	0	8192	1,o	147	5,5,	-	
11-12	12^{00}-12^{00}	11o	0	16384	o,5	136	4,7	-	
12-13	12^{00}-12^{00}	-	0	8192	o,8	143	4,8	-	
13-14	12^{00}- 8^{00}	-	0	-	-	-	-	-	
14	8^{00}-$1o^{3o}$	6	0	16384	-	-	-	-	
Infusion 2oooo E Trasylol iv.)	$1o^{3o}$-12^{3o}	33	0	8192	-	-	-	-	
	12^{3o}-13^{3o}	3o	0	-	-	-	-	-	
	13^{3o}-14^{3o}	2o	-	-	-	-	-	-	
	14^{3o}-15^{3o}	15	-	-	-	-	-	-	
	15^{3o}-16^{3o}	4	-	-	-	-	-	-	
	16^{3o}-18^{00}	6	-	-	-	-	-	-	
		ges.Tagesmenge 108							

Tag	Zeit	Menge (ml)	Trypsin-gehalt (γ ml)	Diastase-gehalt (WE)	Flammenphotometerwerte (mval) Ca	Na	K	Sediment Bakterien Leuko
15	7^{00}- 8^{30}	4						
	8^{30}-11^{00}	22						
	11^{00}-13^{30}	3						
	13^{30}-15^{30}	19	0	32768	1,1	15o	4,65	wurde nicht mehr
	15^{30}-17^{30}	12						untersucht
	17^{30}-19^{30}	15						
	19^{30}-21^{30}	14						
		89						
16	8^{00}-$1o^{00}$	25	0	32768	o,95	15o	5,1	"
Infus.	12^{00}-14^{00}	7	0	32768	1,o5	161	4,3	"
5oooo	14^{00}-16^{00}	12	0	32768	1,o5	147	4,8	"
KIE i.	16^{00}-18^{00}	18	0	8192	-	-	-	
.Fistel	18^{00}-$2o^{00}$	14	0	16384	1,o	15o	4,8	"
	$2o^{00}$-22^{00}	11	0	4o96	o,95	154	4,65	"
		87						
17	6^{00}- 8^{00}	11						
	8^{00}-$1o^{00}$	1o	0	2o48	o,85	139	4,5	"
	$1o^{00}$-12^{00}	11	0					
	12^{00}-14^{00}	9	0					
	14^{00}-16^{00}	6	0					
19	7^{00}-$1o^{00}$	17	0	4o96	1,o5	147	4,45	"
nfus.	$1o^{00}$-12^{00}	17	0	4o96	o,75	153	4,2	
5oooo								
KIE iv.								
	12^{00}-14^{00}	13	0	4o96	o,55	141	4,o	"
	14^{00}-16^{00}	7	0	4o96	-	-	-	
	16^{00}-18^{00}	14	0	2o48	o,8	142	4,25	
	18^{00}-$2o^{00}$	1o	0	-	-	-	-	
	$2o^{00}$-22^{00}	12	0	-	-	-	-	
		9o						
2o	8^{00}-12^{00}	21	0	4o96	o,9	14o	4,1	

Menge

Die Bestimmung der gesamten sezernierten Menge des Sekrets läßt sich, wie schon früher gesagt wurde, nicht durchführen, da nur ein Teil durch die Fistel abfließt. Die abgefangene Menge ist als Maßstab der Sekretion kaum zu gebrauchen, da durch Lageveränderungen der Patientin, Verschieben des Drains und Herauslaufen von BSp neben diesem, Pankreassaft verlorengeht. Die durchschnittliche Menge, die innerhalb von 24 Stunden durch die Fistel ausgeschieden wird, liegt zwischen 11o und 13o ml, wovon am Tag etwa 9o ml, also eine erhebliche größere Menge als in der Nacht, ausgeschieden wird.

Gehalt an aktivem Trypsin

Vom 2. bis 1o. Tag der Untersuchungen ist bei einigen Portionen des Pankreassaftes aktives Trypsin nachweisbar. Seine Menge ist bei den einzelnen Portionen (Sekretionsdauer derselben siehe Tabelle 5) unterschiedlich, sie schwankt zwischen 15 und 113γ/ml. Der Spiegel des aktiven Trypsins ist also nicht konstant, er steigt oder fällt auch nicht gleichmäßig, sondern es wechseln Portionen mit großen und kleinen Trypsinmengen, ja sogar mit inaktiven ab. Vom 1o. Tag an ist kein aktives Trypsin mehr nachweisbar. Da in den ersten 1o Tagen die Portionen des Pankreassekrets nicht in kürzeren Zeitabständen (z.B. zweistündlich wie in den letzten Untersuchungstagen) sondern von 24 Stunden gesammelt wurden, konnte nicht festgestellt werden, in welchem Zusammenhang der Trypsinspiegel mit der Tageszeit und der Nahrungsaufnahme steht.

Diastasegehalt

Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich wird, ist auch der Diastasegehalt von Tag zu Tag, ja sogar innerhalb eines Tages erheblichen Schwankungen unterworfen. Er bewegt sich vom 1. bis 16. Tag zwischen 8192 und 32768 WE. Von da an geht er zurück und bleibt bis zum Ende der Untersuchungen bei 2o48 bis 4o96 WE.

Zwischen den Diastasewerten und dem Gehalt an aktivem Trypsin ist kein Zusammenhang zu erkennen. Zwar liegt am Ende der Versuche der Diastasegehalt am niedrigsten, während gleichzeitig kein

aktives Trypsin nachweisbar ist, aber bei den Untersuchungen vom 1. bis 1o. Tag treffen die Höhepunkte des Diastase- und Trypsingehaltes nicht eindeutig zusammen. So enthält beispielsweise das Pankreassekret am 6. Tag 40 γ aktives Trypsin pro ml und 8192 WE Diastase, am 7. Tag beträgt das Trypsin 44 γ/ ml, während die Diastase auf 32768 WE ansteigt. Am 8. Tag ist kein aktives Trypsin mehr nachweisbar, aber die Diastase ist bei 32768 WE geblieben.

Ein Einfluß der Nahrungsaufnahme und -zusammensetzung auf die Diastasesekretion könnte nur bei Zuführen von entsprechenden reinen Nährlösungen (z.B. Gelatine, Glukose oder Öl) durch eine Sonde sicher festgestellt werden (3o) (34). Da das bei den vorliegenden Untersuchungen nicht der Fall war, sondern die Patientin eine zwar leichte aber gemischte Kost zu sich nahm, kann ein Zusammenhang zwischen Nahrung und Diastaseausscheidung nicht festgestellt werden.

Zusammenhang zwischen Gehalt an Calcium und aktivem Trypsin im Pankreassekret

Der Calciumgehalt des Pankreassekrets schwankt zwischen o,6 und 1,25 mval, gleichgültig ob das Sekret aktives Trypsin enthält oder nicht. Es ist also hier kein Zusammenhang zwischen Ca-Gehalt und Trypsinaktivität feststellbar.

Die allgemeinen Untersuchungen des Bauchspeichels ergeben also, daß im vorliegenden Fall die durch die Fistel ausgeschiedene Tagesmenge stark schwankt und im Durchschnitt 11o-13o ml beträgt, von denen etwa 9o ml während des Tages sezerniert werden. Anfangs wechseln BSp-Portionen, die aktives Trypsin enthalten mit inaktivem Bauchspeichel ab. Vom 1o. Tag an ist kein aktives Trypsin mehr nachweisbar. Der Diastasegehalt des Sekrets schwankt erheblich. Ein Zusammenhang von Trypsin- und Diastasegehalt ist nicht festzustellen. Ein Einfluß der Nahrung auf den Fermentgehalt ist in den vorliegenden Versuchen nicht nachweisbar. Der Calciumgehalt bewegt sich zwischen o,6 und 1,25 mval, wobei kein Zusammenhang mit der Trypsinaktivität erkennbar ist.

Untersuchungen über die Inaktivierungsfähigkeit des Pankreassekrets und sein Verhalten bei Trasylolgaben.

Wenn Pankreassaft, in dem kein aktives Trypsin nachweisbar ist, überschüssigen Inaktivator enthält, dann müßte er zugegebenes Trypsin inaktivieren. Da das in den Experimenten der Fall war, wurde zur genaueren Bestimmung der quantitativen Inaktivierungsfähigkeit folgendermaßen vorgegangen.

In eine Reihe von Gläschen mit 1 ml inaktivem Pankreassekret wurden, wie für eine Trypsineichkurve, steigende Mengen Trypsin einpipettiert (ein Blindwert ohne Trypsin), mit Puffer auf 5,oo ml aufgefüllt und 3o Minuten inkubiert. Dann wurde o,5 ml Substrat zugegeben und nochmals 3o Minuten in den Thermostaten gestellt. Das Weitere wie oben beschrieben.

Nach Abzug des Blindwerts wurde anhand der Eichkurve für Trypsin in aktivem Pankreassekret abgelesen, wieviel aktives Trypsin noch nachzuweisen war. Die Differenz zwischen dem zugegebenen und dem nachgewiesenen Ferment müßte diejenige Trypsinmenge ergeben, die durch den Inaktivator gehemmt worden ist.

Tabelle 6: siehe Seite 46

Die in Tabelle 6 aufgeführten Versuchsergebnisse sind trotz sorgfältiger Durchführung schwankend. Das hat folgende Gründe:

1) Schon in reiner Pufferlösung ist die Inaktivierung von Trypsin und die anschließende quantitative Fermentbestimmung ein sehr komplizierter Vorgang. Im Pankreassaft kommen nun noch Eiweiß und andere Bestandteile dazu, von denen wir nicht wissen, wie sie im einzelnen auf die Reaktion einwirken.

2) Die Bestimmungsmethode für den Inaktivator ist indirekt, da nicht er selbst quantitativ bestimmt wurde, sondern die Abnahme des Trypsins und aus dieser erst die Inaktivierungsfähigkeit des Sekrets abgeleitet wurde. Eine solche indirekte Bestimmung birgt immer Fehlerquellen in sich, und wir können außerdem nicht sagen, ob die Inaktivierung auf den Inaktivator allein oder auch auf andere Faktoren (z.B. Peptide, pH usw.) zurückzuführen ist.

Tabelle 6: Nicht mehr nachweisbares (=inaktiviertes) Trypsin in μ bei Zugabe verschiedener Mengen des Ferments zu inaktivem Pankreassekret.

Zeit	zugegebene Trypsinmenge in μ	13.Tag	14.Tag	15.Tag	16.Tag	17.Tag	19.Tag	2o.Tag
8^{00}-$1o^{00}$	2o	2o	2o 1)	13	2o	2o	2o	2o
	4o	35	4o	-	37	37	4o	4o
	6o	4o	58	-	36	35	58	6o
	1oo	35	58	o	7	13	8o	95
	15o	-	-	-	0	-	-	9o
$1o^{00}$-12^{00}	2o		2o	2o	2)	2o	2o 3)	2o
	4o		4o	4o		35	4o	4o
	6o		46	-		21	58	54
	1oo		15	54		0	52	39
	15o		-	-		-	0	26
12^{00}-14^{00}	2o				0	2o	2o	
	4o				0	38	38	
	6o				0	55	35	
	1oo				0	47	11	
	15o				0	-	0	
14^{00}-16^{00}	2o			2o	2o	2o	2o	2o
	4o			4o	4o	4o	4o	4o
	6o			56	51	5o	54	58
	1oo			3o	48	39	47	66
	15o			-	4o	-	26	47
16^{00}-18^{00}	2o		2o	2o	2o		2o	
	4o		27	4o	37		4o	
	6o		26	49	39		6o	
	1oo		18	37	25		61	
	15o		-	-	0		32	
18^{00}-$2o^{00}$	2o			2o	2o		2o	
	4o			4o	4o		4o	
	6o			39	48		46	
	1oo			26	33		29	
	15o			-	-		11	
$2o^{00}$-22^{00}	2o	2o		2o	2o		2o	
	4o	35		37	4o		4o	
	6o	4o		38	55		52	
	1oo	35		29	45		54	
	15o	-		-	-		44	

Die Essenszeiten sind unterstrichen

Infusion von 2oooo KIE i.v. um 9^{3o}-12^{00} Uhr
Infusion von 3oooo KIE in die Fistel um $1o^{00}$ Uhr
Infusion von 4oooo KIE i.v. von $1o^{00}$-12^{00} Uhr

Deshalb wurden die Versuche nicht nach Inaktivator-Einheiten ausgewertet, sondern nur die Mengen des inaktivierten Trypsins festgestellt.

Verhalten der Inaktivierungsfähigkeit des Pankreassekrets im Laufe des Tages

Tabelle 6 zeigt zunächst, daß die Menge des nicht mehr nachweisbaren (=inaktivierten) Trypsins bei Zugabe verschiedener Fermentmengen zum gleichen Pankreassaft nicht gleich groß ist. Bei etwa 60% der Versuche liegt die größte Inaktivierungsfähigkeit des Sekrets bei Einwirken von 1 ml BSp auf 60 γ Trypsin. (Bei einigen Portionen können diese 60 γ durch 1 ml Pankreassaft vollständig gehemmt werden.) Gibt man größere Enzymmengen zur gleichen Menge desselben BSp, dann wird nur noch eine kleinere Menge gehemmt, als dem Maximum entspräche. Kleinere Trypsinmengen werden völlig inaktiviert.

Die Inaktivierungsfähigkeit des Sekrets schwankt im Laufe des Tages stark. Es läßt sich daher kein deutlicher Zusammenhang zwischen Tageszeit und Hemmfähigkeit erkennen. Auch ein Einfluß der Mahlzeiten ist nicht festzustellen. Anscheinend ist aber der Inaktivatorgehalt am Morgen etwas größer und nimmt dann ab. Es gibt aber auch Tage (15. und 17. Tag), an denen der Pankreassaft mittags bzw. nachmittags die größte Inaktivierungsfähigkeit zeigt.

Verhalten der Inaktivierungsfähigkeit bei Trasylolgaben

Es interessierte nun, ob eine Änderung der Inaktivierungsfähigkeit des Pankreassaftes bei Trasylolgaben festzustellen ist. So wurden am 14. Tag 20000 E, in 500 ml NaCl intravenös verabreicht. Die Infusion dauerte von 9^{30} bis 12^{00} Uhr.

Die Inaktivierungsfähigkeit ist in der ersten Portion dieses Tages (8^{00}-10^{00} Uhr) am größten. Da sie aber den Pankreassaft von vor und während der Infusion enthält, ist nicht ersichtlich, ob der Inaktivatorgehalt durch die Trasylolgabe beeinflußt wurde. Am Abend ist die Hemmfähigkeit am geringsten. Gegenüber dem vorhergehenden und dem folgenden Tag, an denen kein Trasylol verabreicht wurde, besteht im wesentlichen kein Unterschied.

Um einen besseren Überblick und bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurde vom 15. Tag an möglichst zweistündlich die Inaktivierungsfähigkeit untersucht (außer wenn die aufgefangenen Sekretmengen zu gering waren).

Am 19. Tag wurde noch einmal Trasylol und zwar 40000 E in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung infundiert (10^{15}-12^{30} Uhr). An diesem Tag war die Trypsin-Hemmfähigkeit zwischen 8^{00} und 10^{00} Uhr, also vor der Trasylolgabe, am höchsten. Während der Infusion sank sie geringgradig ab, erreichte ihren niedrigsten Stand nach Ende der Infusion zwischen 12^{00} und 14^{00} Uhr, stieg dann wieder an, um zwischen 16^{00} und 18^{00} Uhr einen zweiten Höhepunkt zu erreichen und schließlich wieder abzusinken. Auch hier ist kein wesentlicher Unterschied des Inaktivatorgehaltes gegenüber den Tagen, an denen kein Trasylol verabreicht wurde, festzustellen. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, wie gering die zugeführte Inaktivatormenge pro ml Körperflüssigkeit ist. Außerdem ist das Trasylol sehr langsam infundiert worden, so daß es inzwischen schon ausgeschieden worden sein kann.

Augenfälliger ist das Ergebnis bei Infusion von 30000 E Trasylol unverdünnt in die Fistel, wie es am 16. Tag durchgeführt worden ist. Nach der Injektion um 10^{00} Uhr wurde das Drain 2 Stunden lang verschlossen. Das Pankreassekret, das zwischen 12^{00} und 14^{00} Uhr aufgefangen wurde, inaktivierte alle zugegebenen Trypsinmengen (es wurden bis 150 γ verwendet) vollständig. Die nächsten abgenommenen Portionen zeigten eine gegenüber anderen Tagen normale Inaktivierungsfähigkeit.

Die Untersuchungen über den Einfluß von Trasylol auf die Inaktivierungsfähigkeit des inaktiven Bauchspeichels sagen nichts über die Wirkung des Präparates auf Pankreassaft, der aktives Trypsin enthält. Sie kann dort ganz anders sein.

Bei Aktivierung der proteolytischen Fermente eines Speichelergusses im Interstitium beginnt die eigentliche Entzündung. Das Trasylol gelangt vermutlich durch das entzündliche Ödem dorthin und kann nun auf das Trypsin einwirken. Wie schon gesagt wurde, hemmt es aber auch Kallikrein und besitzt zu diesem eine weit größere Affinität als zum Trypsin. Außerdem wird das Trasylol

in der Körperflüssigkeit verdünnt und das entzündliche Ödem enthält nur einen geringen Teil derselben. So ist es auf jeden Fall angebracht, verhältnismäßig hohe Inaktivatordosen zu verabreichen, um eine merkliche Erhöhung des Hemmkörpergehalts im Interstitium des Pankreas zu erreichen.

(An dieser Stelle soll kurz erwähnt werden, daß das Sekret aus einer anderen Pankreasfistel, das aktives Trypsin enthielt, nach Injektion von 40000 KIE in die Fistel keinerlei Aktivität mehr zeigte. Auch in den nächsten Tagen war kein aktives Trypsin mehr nachweisbar und das subjektive Befinden des Patienten besserte sich. Aus technischen Gründen waren weitere Untersuchungen nicht durchführbar.)

Die Untersuchungen über die Inaktivierungsfähigkeit des Bauchspeichels, der kein aktives Trypsin enthält, ergaben, daß das Maximum der Inaktivierungsfähigkeit innerhalb einer Versuchsreihe (Zugabe steigender Mengen von 20-150 γ Trypsin zum BSp) bei etwa 60% der Versuche bei Einwirken von 1 ml Sekret auf 60 γ liegt. Läßt man dieselbe Menge BSp auf eine größere Menge des Ferments einwirken, so wird weniger Trypsin gehemmt als es dem Maximum entspräche. Die Inaktivierungsfähigkeit schwankt im Laufe des Tages stark. Bei Trasylolinfusionen ist keine Änderung der Inaktivierungsfähigkeit des Bauchspeichels festzustellen. Anders ist es bei Injektion von unverdünntem Trasylol in die Fistel. In diesem Fall inaktiviert das 2 Stunden später aufgefangene Sekret (das Drain war bis dahin verschlossen worden) zugegebene Trypsinmengen bis zu 150 γ. Der Inaktivator wird anscheinend weder verbraucht noch zerstört. Die nächsten 2-Stunden-Portionen zeigen wieder normale Inaktivierungsfähigkeit.

Untersuchungen über die Stabilität des aktiven Trypsins in Pankreassaft

Es wurde Pankreassekret verwendet, das aktives Trypsin enthielt. Die Portionen wurden sofort nach Entnahme in einen Kühlschrank (+4°C) gestellt. Nur über längere Zeit wurde der Pankreassaft im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Die Aktivität wurde an 1,oo ml, 2,oo ml und 3,oo ml in verschiedenen Zeitabständen geprüft. Innerhalb des Tages, an dem der Pankreassaft abgenommen wurde, konnte kaum eine Aktivitätsabnahme festgestellt werden.

Abbildung 9: Beständigkeit des Trypsins

Abbildung 9 zeigt die Mengen Trypsin in γ, die an verschiedenen Tagen bei zwei Portionen Pankreassekret gemessen wurden.
Bei Portion A nimmt der Trypsingehalt langsam ab und zwar innerhalb der ersten 4 Tage um 3o%, vom 4. bis 11. Tag um weitere 37%, so daß am 11. Tag nur noch 33% der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen werden können.

Die Aktivität bei Portion B geht wesentlich schneller zurück. Am 2. Tag hat sie schon um etwa 4o% und von da bis zum 4. Tag um weitere 14% abgenommen. Hier ist also am 4. Tag nur noch eine durchschnittliche Trypsinaktivität von 46% vorhanden.

Wie bei den Versuchen mit Trypsin in Pufferlösung ist also auch hier anfangs ein rascherer, später ein langsamerer Aktivitätsverlust festzustellen.

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Darlegung der heutigen Kenntnisse über das Trypsin und seine Beziehung zur Bauchspeicheldrüse wurden im experimentellen Teil der Arbeit zunächst Untersuchungen über Reintrypsin (kristallisiertes Trypsin) und seinen Inhibitor (Trasylol) in Pufferlösung beschrieben. Zur quantitativen Bestimmung des Trypsins wurde die von Riedel und Wünsch entwickelte Methode verwendet, bei der das Kupplungsprodukt von Echtblausalz B mit β-Naphthylamin, das durch Trypsin aus N^{α}-Benzoyl-DL-arginin-β-naphthylamid-hydrochlorid (Substrat) abgespalten wird, kolorimetrisch bestimmt wird.

Versuche uber das Verhalten des Ferments bei verschiedenen Inkubationszeiten, die bei 37°C und pH 7,8 durchgeführt wurden,

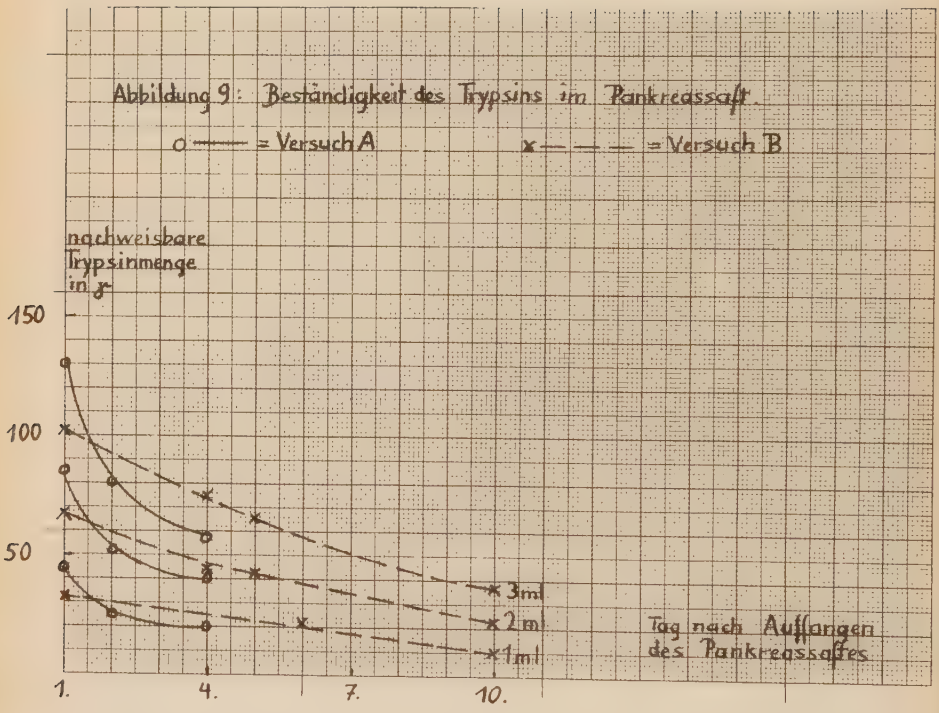


Abbildung 9: Beständigkeit des Trypsins im Pankreassaft
o —— = Versuch A
x — — — = Versuch B
nachweisbare Trypsinmenge in g
150
100
50
3ml
2ml
1ml
Tag nach Auffangen des Pankreassaftes
1.
4.
7.
10.

zeigten, daß seine Aktivität bei Inkubation innerhalb kurzer Zeit erheblich abnimmt. Dieser Aktivitätsverlust geht zunächst sehr rasch, dann immer langsamer vor sich. Nach 3o Minuten ist nur noch etwa die Hälfte, nach 1 Stunde etwa ein Drittel der Aktivität vorhanden und nach 5-7 Stunden ist völlige Inaktivität des Ferments eingetreten. Diese rasche Selbstinaktivierung des Ferments durch Autolyse und Bildung von "inertem" (reaktionsträgem) Protein dürfte zurückzuführen sein auf die hohe Temperatur, das hohe pH und die Tatsache, daß das Trypsin nicht (beispielsweise durch Ca-Ionen) stabilisiert ist.

Bei der Untersuchung der Inaktivierung des Trypsins durch den Trypsin- und Kallikrein-Inaktivator Trasylol fand sich, daß die Geschwindigkeit dieser Reaktion sehr groß ist. Sie scheint innerhalb von Sekunden vor sich zu gehen, da bei 15 Minuten Voringkubation kaum eine größere Inaktivierung nachzuweisen ist als bei sofortiger Zugabe von Substrat.

Was die Größe der Inaktivierungsfähigkeit anlangt, so sind 90 KIE Trasylol fähig, 1oo γ Trypsin bei 3o Minuten Inkubation vollständig zu inaktivieren. 5o KIE hemmen 1oo γ zu etwa 63%. Bei Zugabe von Trasylolmengen, die nicht imstande sind, die jeweilige Fermentmenge zu inaktivieren, fällt auf, daß die Trypsinaktivität wesentlich langsamer abnimmt, als bei Inkubation von Trypsin ohne den Inhibitor. Nach 24 Stunden Inkubation von 1oo γ Trypsin mit 4o KIE Trasylol sind noch etwa 15% Aktivität nachzuweisen, während bei Inkubation von Trypsin allein schon nach spätestens 7 Stunden das Ferment vollständig inaktiviert ist. Das läßt darauf schließen, daß bei Vorhandensein einer Trasylolmenge, die das Trypsin nicht vollständig hemmen kann, der Inhibitor stabilisierend auf das Ferment wirkt. Daraus geht hervor, daß ein hoher Hemmkörpergehalt des Trypsin-Inaktivator-Gemisches notwendig ist, um eine vollständige Inaktivierung zu erreichen und eine Stabilisierung des Ferments durch den Hemmkörper auszuschalten.

Wenn diese stabilisierende Wirkung ungenügender Inaktivatormengen auch in vivo gilt, so wäre hiermit eine Erklärung und Rechtfertigung für die von der Klinik gestellte Forderung nach einer hohen Dosierung des Medikaments gegeben.

Versuche mit dem Sekret einer Pankreasfistel haben Folgendes gezeigt: Wegen des Eiweißgehaltes des Bauchspeichels war zunächst eine Modifizierung der angewandten Trypsinbestimmungsmethode notwendig. Dann wurde die Zusammensetzung des Sekrets und sein Trypsin- und Diastasegehalt untersucht. Die Menge des durch die Fistel ausgeschiedenen Bauchspeichels, die natürlich nur ein Teil des insgesamt produzierten Pankreassekrets ist, betrug pro Tag etwa 11o - 13o ml, schwankte aber stark. Aktives Trypsin war vom 2. bis 1o. Tag der Untersuchungen mehrmals in sehr unterschiedlichen Mengen nachweisbar. Der Gehalt an aktivem Trypsin war also nicht konstant, sondern es wechselten Portionen mit großen und kleinen Trypsinmengen ab, ja sogar mit solchen, in denen gar kein aktives Trypsin enthalten war. Vom 1o. Tag an war der Bauchspeichel inaktiv. Auch der Diastasegehalt des Sekrets war unterschiedlich. Zwar war er am Anfang der Untersuchungen im allgemeinen höher und ging dann zurück, es ist aber weder ein Zusammenhang mit der Sekretion von aktivem Trypsin, noch mit Nahrungsaufnahme und -zusammensetzung zu erkennen. Auch ein Einfluß des Calciumgehaltes auf die Trypsinaktivität ist nicht feststellbar.

Aus der Tatsache, daß das Sekret bei Inaktivität fähig ist, Trypsin zu hemmen, wurde geschlossen, daß es überschüssigen Inaktivator enthält. Deshalb wurde die Inaktivierungsfähigkeit quantitativ bestimmt. Da die Trypsinbestimmung im Pankreassaft anfangs methodische Schwierigkeiten machte, konnte bedauerlicherweise die Wirkung von Trasylolgaben nicht untersucht werden, solange das Sekret Trypsinaktivität zeigte. Untersuchungen bei Inaktivität ergaben, daß bei Infusion von Trasylol in NaCl über längere Zeit keine Änderungen der Hemmfähigkeit des Sekrets eintraten. Es besteht demnach kein Anhalt dafür, daß der Inhibitor aktiv im Bauchspeichel ausgeschieden wird. Bei Injektion von unverdünntem Inhibitor in die Fistel wurde zwei Stunden später eine erhebliche Erhöhung der Inaktivierungsfähigkeit festgestellt. Der Inaktivator scheint also nicht zerstört oder verbraucht worden zu sein. Nach weiteren zwei Stunden hatten sich die Verhältnisse normalisiert.

Bei den Untersuchungen am Pankreassaft ist zu berücksichtigen, daß im Fistelsekret auch entzündliches Exsudat, in dem Inhibitor enthalten ist, ausgeschieden wird. Wenn aber diese Experimente am inaktiven Sekret trotzdem Schlüsse ziehen lassen, die auch für den aktives Trypsin enthaltenden Bauchspeichel gelten, dann würde das wieder bedeuten, daß hohe, unverdünnte Inaktivatordosen injiziert werden müssen, um einen merklichen Effekt auf das in der Bauchspeicheldrüse aktiv werdende Trypsin auszuüben. Die Notwendigkeit der hohen Dosierung wird auch verständlich, wenn man bedenkt, daß das Trasylol in der Körperflüssigkeit sehr verdünnt wird und das entzündliche Exsudat nur einen kleinen Teil derselben enthält. Zudem wirkt der Inhibitor zugleich auf das Kreislaufhormon Kallikrein, zu dem er eine weit größere Affinität besitzt als zum Trypsin.

Sowohl die Versuchsergebnisse bei Inaktivierung von kristallisiertem Trypsin durch Trasylol in Pufferlösung, als auch die Tatsache, daß sich der Inaktivatorspiegel bei Infusion verdünnten Präparats über längere Zeit nicht merklich ändert, während bei dem kurz erwähnten 2. Fall durch massive Dosen ein bleibender Rückgang des aktiven Trypsins erzielt werden konnte, lassen eine hohe Dosierung des Inaktivators angezeigt erscheinen.

Literatur

1 Anson M.L. und A.E. Mirsky: Protein Coagulation and its Reversal; Reversal of Coagulation of Hemoglobin. J.gen. Physiology 13, 133-143 (1929)

2 Asang E.: Moderne chirurgische Therapie der Pankreasnekrose. Langenbecks Arch. 293, 645-67o (196o)

3 Asang E.: Intra- und postoperativer Hemmkörperschutz als Pankreatitis- und Pankreasnekrose-Prophylaxe. Langenbecks Arch. und Dtsch. Z. Chir. 294, 83-1o2 (196o)

4 Asang E.: Hemmkörpertherapie der akuten und postoperativen Pankreatitis; Rückschlüsse aus der modernen Therapie auf Ätiologie und Pathogenese der Pankreatitis und Pankreasnekrose. Langenbecks Arch. u. Dtsch. Z. f. Chir. 294, 3o5-33o (196o)

5 Asang E. und Mittelmeier. Arch.Kreislaufforschung 26, 143 (1957); Bruns Btr. klin. Chir. 195, 219 (1957)

6 Asang E. und G. Maurer: Neuartige Gesichtspunkte in Diagnostik und Therapie der Pankreatitis. Medizinische Monatsschrift, 12, 782-787 (196o)

7 Bedacht R.: Pankreatitisbehandlung mit einem Kallikrein-Inaktivator. Ärztl. Forschung 12, Heft 7, 371-376 (1958)

8 Bedacht R.: Behandlungen akuter und chronischer Bauchspeicheldrüsen-Erkrankungen. Ärztl. Praxis 1o Nr. 5o (1958)

9 Bedacht R.: Zur Klinik der chronisch rezidivierenden Pankreatitis. MMW 1o2, 367-369 (196o)

10 Bellmann G.: Die akute Pankreatitis und ihre Behandlung. Med. Monatsschrift 14, Heft 1, 15-17 (196o)

11 Berrard A., M. Paget., P. Lamelin: Trypsinogen-Trypsin und seine Hemmstoffe in der akuten Pankreatitis. Arch. des Maladies de l'Appareil digestif et des Malad. de la Nutrit. 5, 632-643 (196o)

12 Bier M. u. F.F. Nord: On the Mechanism of Encyme Action. The Effect of Certain Ions on Crystalline Trypsin and Reinvestigation of its Isoelectric Point. Arch. Biochem. Biophys. 33, 32o (1951)

13 Doerr W.: Fermententgleisung im Pankreas patholog. anatomisch gesehen. Ärztl. Wschr. 1953, 681-690

14 Doerr W.: Patholog.-anatom. Untersuchungen zum Problem der Fermententgleisung. Verh. dtsch.Ges.Pathol. 37, 292-298 (1954)

15 Flaschenträger B. u. E. Lehnartz: Physiolog. Chemie. Springer Verlag Berlin, 1951.

16 Forell M.M.: Zur Therapie der akuten Pankreatitis. Langenbecks Arch. 292, 610-614 (1959)

17 Frey E.K.: Zur Therapie der Pankreatitis. Therapiewoche 4, 323 (1953/54)

18 Gorini L.: Rôle du Calcium dans le système Trypsin-Serumalbumine. Biochim. et Biophys. Acta, 7, 318 (1951)

19 Gülzow M.: Biolog. Grundlagen der Fermentdiagnostik von Pankreaserkrankungen. Med. Klinik 15,(1959)

20 Hoesch K.: Über den primären Trypsinangriff im Pankreas, in den Gallenwegen und der Leber. Z. klin. Med. 110, 735-744 (1929)

21 Kraut H., E.K. Frey, E. Bauer.: Über ein neues Kreislaufhormon. Z. physiol. Chem. 175, 97, (1928)

22 Kunitz M. u. J. Northrop: Inactivation of Crystalline Trypsin. J.gen. Physiology 17, 591-615 (1934)

23 Kunitz M., J.H. Northrop: Isolation from Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, Trypsin Inhibitor and an Inhibitor-Trypsin Compound. J. gen. Physiol. 19, 991 (1936)

24 Kunitz M.: Effect of the Formation of Inert Protein on the Kinetics of the Autocatalytic Formation of the Trypsin from Trypsinogen. J. gen. Physiol. 22, 293-310 (1939)

25 Kunitz M.: Formation of Trypsin from Crystalline Trypsinogen by Means of Enterokinase. J. gen.Physiol. 22, 429-446 (1939)

26 Maurer G.: Postoperative Pankreatitis. Langenbecks Arch.u. Dtsch. Z. Chir. 292, 601-609 (1959)

27 Maurer G. u. E. Asang: Gallenstein und Bauchspeicheldrüse. Med. Klinik 55. Jahrgang, 16, 630-635 (1960)

28 Nehrbauer E.: Beobachtung der Inaktivierung des tryptischen Ferments im Fistelsekret einer Pankreascyste durch Anwendung von Trasylol. MMW 45, 2019-2020 (1959)

29 Neurath H.: The Proteins. Chemistry, biol. activity and Methods. New York 1953-54 Academie Pr.

3o Newman E.A., M. Eisenstein: Observations on a Patient with Pancreatic Fistula. Gastroenterology 13, 528-535 (1949)

31 Nord F.F., M. Bier und L. Terminiello: On the Mechanism of Enzyme Action LXI. The Self Digestion of Trypsin, Calcium-Trypsin and Acetyltrypsin. Arch biochem. biophysics 65, 12o (1956)

32 Riedel A., E. Wünsch und A. Hartl: N^{α}-Benzoyl-arginin-β-Naphthylamid als Substrat zur quantitativen Bestimmung von Trypsin. Hoppe-Seyler's Zschr. f. Physiolog. Chemie 316, 61-7o (1959)

33 Schepowalnikow NP.: Jahresbericht über d. Fortschritte der Tierchemie 29, 378 (19oo). Diss. Ing. St. Petersburg 1899.

34 Sinclair I.S.R.: Observations on A Case of External Pancreatic Fistula in Man. Brit. J. of Surgery, 44, 25o-262 (1956)

35 Werle E.,L. Maier und E. Ringelmann: Hemmung von Proteinasen durch Kallikrein-Inaktivatoren. Naturwiss. 39, 328 (1952)

36 Werle E., M.M. Forell, L. Maier: Zum Mechanismus der Blutdruckwirkung des Trypsins. Naturwiss. 4o, 627-628 (1953)

37 Werle E., M.M. Forell und L. Maier: Zur Kenntnis der blutdrucksenkenden Wirkung des Trypsins. Arch,exp. Path. u. Pharm. 225, 369-38o (1955)

38 Werle E., K. Tauber, W. Hartenbach und M.M. Forell: Zur Frage der Therapie der Pankreatitis. Münch. med. Wschr. 35, 1265-1267 (1958)

39 Werle E., W. Appel und E. Happ: Über den Kallikrein-Inaktivator aus Kartoffeln und seine Abgrenzung gegen Proteinase-Inhibitoren. Z. Vitamin-Hormon-Fermentforschung 1o, 127-136 (1959)

4o Werle E. und W. Appel: Über einen Hemmkörper für Kallikrein und verschiedene Proteinasen aus Rinderleber. II. Zschr. Naturforsch. 14b, 385-392 (1959)

41 Willstätter R., E. Waldschmidt-Leitz, S. Dunaiturria S. und G. Künster: Zur Kenntnis des Trypsins. XV. Abhandlung über Pankreasenzyme. Hoppe-Seyler's Zschr. f. physiolog. Chemie, 161, 191 (1926)

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Professor Dr. med. G.Maurer, Direktor des Krankenhauses München rechts der Isar und Chefarzt der Chirurgischen Abteilung, für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis zur Auswertung des Untersuchungsmaterials herzlich zu danken.

Großen Dank schulde ich auch Herrn Dr. med. E.Asang für die erteilten Anregungen und Ratschläge und den Herren Dr. A.Riedel und Dr. E.Wünsch für die tatkräftige Unterstützung der physiologisch-chemischen Arbeiten.

Lebenslauf

Ich bin am 17. April 1936 in Breslau/Schlesien als erstes Kind des Malers und Graphikers Helmut Degel und seiner Ehefrau Senta geb. Brauer geboren. Mein Schuleintritt erfolgte im September 1942 in eine Volksschule in Breslau. 1944 wurde ich zusammen mit meiner Familie von dort evakuiert, 1945 aus Schlesien ausgewiesen. Im Februar 1945 kamen wir nach Oberösterreich, im Herbst desselben Jahres wurden wir von da nach Neubronn/ Württemberg ausgewiesen und kamen schliesslich im Frühjahr 1946 nach Aßling/Obb. Infolge von Evakuierung und Ausweisung besuchte ich sieben verschiedene Volksschulen, zuletzt die in Aßling. Im September 1947 wurde ich an das Realgymnasium für Mädchen in Rosenheim aufgenommen. Da ich mit meiner Familie seit 1952 in Baldham bei München wohne, besuchte ich während der letzten vier Schuljahre das Luisengymnasium in München, wo ich im Sommer 1956 das Abitur machte.

Im Wintersemester 1956/57 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Studium der Medizin, und bestand dort nach dem 5. Semester im Februar 1959 die ärztliche Vorprüfung. Außer dem Wintersemester 1959/60, das ich an der Universität Wien verbrachte, habe ich immer in München studiert. Am 7. Juni 1962 schloß ich das Studium mit dem medizinischen Staatsexamen ab.

Am 9. Oktober 1961 verheiratete ich mich mit Dr. Konrad Seidl.